Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft mit Hilfe des Katalase-Testes

Karl Kretzer

1962

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. L. Kotter

NACHWEIS VON HEMMSTOFFEN IN LEBENSMITTELN TIERISCHER HERKUNFT MIT HILFE DES KATALASE-TESTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Karl Kretzer
Tierarzt
aus
Haidgau (Ravensburg)

München 1962

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Ullrich
Referent: Professor Dr. L. Kotter

Tag der Promotion: 27. Februar 1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

UNI-Druck, München 13, Amalienstraße 85

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Schrifttum	3
I. Hemmstoffe	3
II. Biologische Hemmstofftests	11
III. Testmikroben	18
IV. Katalase	19
C. Eigene Untersuchungen	24
I. Allgemeines zur Versuchsanordnung	24
II. Untersuchungen zur Ermittlung optimaler Voraussetzungen für die Durchführung des Katalase-Hemmstofftestes	25
III. Prüfung des Katalase-Hemmstofftestes an hemmstoffhaltigen Nährlösungen	35
IV. Prüfung des Katalase-Hemmstofftestes an hemmstoffhaltigen Lebensmitteln	36
D. Diskussion	44
E. Zusammenfassung	46
F. Literaturverzeichnis	47
Lebenslauf	56

A. Einleitung

Die Haltbarmachung bestimmter Lebensmittel durch Hitze stößt dann auf Schwierigkeiten, wenn die zur Sterilisierung erforderlichen Temperaturen gleichzeitig auch Beschaffenheit und organoleptische Eigenschaften nachteilig beeinflussen. Dies trifft insbesondere für Halbkonserven, aber auch für die meisten Fleischwaren in Dosen zu.

Auch die Aufbewahrung roher Lebensmittel, z.B. von Fleisch, Geflügel und Fisch in gekühltem Zustand, ist nur begrenzt möglich, da psychrophile oder psychrotolerante Keime bald zur Verderbnis führen.

In beiden Fällen, bei Konserven und bei kühl gelagerten Lebensmitteln, wird immer wieder versucht, die Haltbarkeit durch Zusatz von Hemmstoffen zu verbessern. Vielfach soll damit mangelhafte Hygiene überdeckt werden. Der Zusatz derartiger Stoffe kann unter Umständen gesundheitsschädlich sein, auf jeden Fall ist er lebensmittelrechtlich unzulässig. Man müht sich daher schon längere Zeit, besonders aber nach der Einführung der Antibiotika um Nachweismöglichkeiten für diese Stoffe.

Chemische Nachweismethoden sind für einen bestimmten Stoff oder eine bestimmte Stoffgruppe spezifisch. Da für die Konservierung aber eine große Zahl von Stoffen in Frage kommt, ist die chemische Untersuchung im Routinebetrieb von vornherein problematisch, wenn nicht ein bestimmter Verdacht vorliegt oder aus bestimmten Gründen nur eine bestimmte Gruppe von Konservierungsmitteln ausgeschlossen werden soll. Außerdem sind die zur Konservierung ebenfalls geeigneten Antibiotika auf chemischem Wege in geringen Konzentrationen praktisch nicht zu erfassen.

Mit biologischen Methoden können unterschiedliche Stoffe und schon kleine Mengen erfaßt werden, sofern die Testkeime entsprechend große Empfindlichkeit aufweisen.

Da die schon längere Zeit bekannten biologischen Hemmstoffteste noch nicht voll befriedigten, wurde am Institut ein Test (42) erarbeitet, der bei einfacher Durchführung viele Hemmstoffe mit hoher Empfindlichkeit erfaßt. Da dieser Test auf dem reduktometrischen Prinzip beruht und in einzelnen Fällen bei starker Eigenfarbe die Ablesung schwierig war, wurde von TERPLAN (84) eine Variante dieses Testes entwickelt, bei dem das Wachstum der Testkeime auf Grund der Katalasebildung kontrolliert wird.

Mir war nun die Aufgabe gestellt worden, optimale Bedingungen zur Durchführung des Katalasetestes zu ermitteln und einige Lebensmittel tierischer Herkunft praktisch zu prüfen.

B. Schrifttum

I. Hemmstoffe

1. Begriff und Allgemeines

Der Begriff "Konservierungsmittel" ist weder in der neuen Fassung des Lebensmittelgesetzes vom 23.12.1958 noch in der Konservierungsstoff-VO vom 19.12.1959 eigens definiert, da die Konservierungsmittel allgemein als Fremdstoffe gelten. Nach einem früheren Entwurf zu einer beabsichtigten Konservierungsmittel-VO (19) versteht man unter Konservierungsmitteln "chemische Stoffe, die bei der Gewinnung, Herstellung, Zubereitung oder Aufbewahrung von Lebensmitteln dazu dienen, Kleinlebewesen in ihrer Entwicklung zu hemmen oder abzutöten, hierdurch das Verderben der Lebensmittel zu verzögern oder zu verhindern und die Lebensmittel länger genußtauglich zu halten". Eine weitergefaßte Begriffsbestimmung (19) besagt: "Chemische Konservierungsmittel sind Chemikalien sowie Mischungen oder Zubereitungen daraus, die zur Haltbarmachung von Lebensmitteln bestimmt sind".

Nach diesen Begriffsbestimmungen gehören auch die Antibiotika zu den Konservierungsmitteln, obgleich sie - wohl mit Rücksicht auf ihre therapeutische Anwendung - im Schrifttum gewöhnlich nicht als solche bezeichnet werden, sondern gegenüber den sogenannten "klassischen", "chemischen" Konservierungsmitteln im engeren Sinne abgegrenzt werden. Für beide Wirkstoffgruppen wählt man daher besser den Begriff Hemmstoffe, dem dann auch weitere, mikrobiell wirksame Stoffe, wie z.B. Desinfektionsmittel, zugerechnet werden können.

2. Natürliches Vorkommen

In bestimmten Nahrungsmitteln kommen Hemmstoffe von Natur aus vor. So sind Benzoesäure oder deren Ester z.B. in Preiselbeeren bis zu 0,24 % (27) enthalten. In Spuren kommt Salizylsäure in Himbeeren, Vogelbeeren und Trauben vor, Sorbinsäure in Vogelbeeren. Milchsäure, ein im Stoffwechsel höherer Lebewesen sehr wichtiger Faktor, hat ebenfalls eine beachtliche konservierende Wirkung. Sie entsteht z.B. bei der Milchsäuregärung im Sauerkraut und in sauren Gurken. Von den Körperflüssigkeiten enthält die Galle Inhibine (42). Darüber hinaus sind im biologischen Bereich auch andere orga-

nische Verbindungen mit mehr oder minder starker konservierender Wirkung zu finden. Dazu gehören insbesondere die Antibiotika, die sowohl von Einzellern als auch von vielzelligen Makroorganismen gebildet werden.

3. Wirkungsweise

HOTCHKISS (29) unterscheidet folgende Stufen antimikrobieller Wirkung:

a) Es kann ein physiko-chemischer Prozeß eintreten, der in einer Anhäufung des wirksamen Agens auf oder innerhalb des Mikroben besteht (Diffusion, Adsorption, aktive Adsorption).
b) Das Agens reagiert ab einer bestimmten Konzentration mit Zell- oder Hemmstoffbestandteilen.
c) Die Reaktion bewirkt die Unterbrechung normaler Zellfunktionen.
d) Die Unterbrechung verursacht allmähliche oder sofortige Änderung der biochemischen Wachstumsprozesse.

Zur Konservierung durch chemische Stoffe (27) können die Keime entweder vernichtet oder im Wachstum gehemmt werden.

Eine Entwicklungshemmung von Mikroorganismen kann durch Wechselwirkung mit einem unentbehrlichen Bestandteil auf drei Arten bewirkt werden (27):

a) durch Oxydation eines Stoffes, der in reduzierter Form aktiv ist oder durch Reduktion, wenn die oxydierte Form wirksam ist;
b) durch chemischen Umsatz infolge Salzbildung, Addition, usw., z. B. durch Inaktivierung mittels Sublimat, Phenol, basischen Farbstoffen;
c) durch Konkurrenzhemmung (Antagonismus bzw. Interferenz eines wesentlichen Stoffwechselfaktors, z. B. mittels Blockierung der p-Aminobenzoesäure u. a.).

Bei einer Reihe von Stoffen kann der hemmende Effekt auf Mikroorganismen zumindest teilweise auch durch Hemmung der Häminenzyme erklärt werden. Nach LÜCK (51) beruht diese in erster Linie auf einer Reaktion der nicht dissoziierten Verbindungen mit der Häminkomponente. Nur die nicht dissoziierte Säure hemmt, das Säureanion ist wirkungslos. So bewirken Bromessigsäure Peroxydasehemmung, Ameisensäure Peroxydase- und Katalasehemmung, Benzoe-, Propion- und Sorbinsäure ebenfalls Katalase-Hemmung. Alle diese Säuren zeigen bei $p_H 7$ keine oder nur geringe Hemmwirkung, diese nimmt aber mit steigender Wasserstoffionenkonzentration zu.

Die Häminenzymhemmungen (51) können reversibel oder irreversibel erfolgen. Die Gefährdung des Menschen ist um so geringer, je mehr sich eine Hemmung rückgängig machen läßt, wenn der Inhibitor ausgeschieden oder ab- oder umgebaut ist. Bei reversiblen Katalasehemmungen ist die H_2O_2-Spaltung gegenüber der Kontrolle verzögert, steht im Endeffekt dieser jedoch nur wenig nach. Die Hemmung durch Sorbin-, Salizyl-, Fumar- und Maleinsäure sowie durch p-Oxybenzoesäureäthylester ist in stärkerem Umfang mit irreversiblen Veränderungen verbunden. Zwischen Stärke der Katalasehemmung und konservierender Wirkung bestehen folgende Beziehungen: Bei Ameisensäure sind, verglichen mit anderen Fettsäuren, beide Effekte am größten. p-Oxybenzoesäureäthylester besitzt im Gegensatz zur Benzoesäure im schwachsauren und neutralen Gebiet guten Konservierungseffekt, zeigt aber dort nur geringe Katalasebeeinflussung. Die Hemmung der Peroxydase ist p_H-unabhängig, die der Katalase bei p_H 7 gering und bei p_H 4,5 stark. Die Art und Weise, wie es über die Katalasehemmung zum konservierenden Effekt kommt, ist noch ungeklärt.

4. Bedeutung der Hemmstoffkonzentration

Untersuchungen von RAIBLE (69, 70) über die Wirkung von Konservierungsmittelkonzentrationen auf die Vermehrung von Hefen haben gezeigt, daß der Verlauf der Wachstumskurven in enger Beziehung zur angewandten Konservierungsmittelkonzentration steht. Ebenso besteht ein enger Zusammenhang zwischen der angewandten Konzentration und der schließlich erreichten Zelldichte. Bei steigender Konzentration wird die zur Erreichung der doppelten Zelldichte erforderliche Zeit immer größer, bei einer bestimmten Konzentration schließlich erreicht sie den Wert "unendlich".

v. SCHELLHORN (73) prüfte ebenfalls die Wirkung einer Reihe von Konservierungsmitteln in verschieden hohen Konzentrationen auf Hefen und kam zu anderen Ergebnissen. Das System Substrat-Konservierungsmittel-Mikroben strebt stets entweder dem Absterben aller vorhandenen Mikroben oder der Vermehrung mit den Erscheinungen des organoleptisch wahrnehmbaren Verderbs zu. Eine rein statische, lediglich in Vermehrungshemmung bestehende Wirkung der Konservierungsmittel auf die Mikroben wurde nie beobachtet. Bei genügend hohen Konzentrationen der Konservierungsmittel entsprach der zeitliche Ablauf des Absterbens sämtlicher vorhandener einzelliger Mikroorganismen, vorausgesetzt, daß es sich um einheitliches Material handelte, einer monomolekularen Reaktion. Bei niedrigen Konzentrationen von Kon-

servierungsmitteln wurde allmählich eine Verlangsamung des Absterbevorganges beobachtet, die sogar in erneute Vermehrung übergehen konnte. Bei gleichen Konzentrationen und gleicher Zeit war die Absterberate dann höher, wenn Nährsubstrat oder Temperatur für das Wachstum der Mikroben ungünstig waren.

5. Einfluß des p_H-Wertes

Die Konservierungsmittel kann man nach v. SCHELLHORN (74) einteilen in solche mit Säure- oder Salzcharakter, die ihrer chemischen Natur entsprechend nur bei sauren p_H-Werten des Systems Substrat-Konservierungsmittel wirksam sind, und in solche, die auch bei neutralem p_H-Wert brauchbar sind. Bei der ersten Gruppe wirken nur die undissoziierten Anteile. Der undissoziierte und damit mikrobiologisch wirksame Anteil ist um so größer, je niedriger der p_H-Wert des Substrates ist. Die Abnahme des undissoziierten und damit mikrobiologisch wirksamen Anteils mit steigendem p_H-Wert ist von der Dissoziationskonstante der betreffenden Säure abhängig. Die folgende, von v. SCHELLHORN zusammengestellte Tabelle gibt Aufschluß über die p_H-Abhängigkeit der Dissoziation bei verschiedenen Säuren. Es geht daraus hervor, daß die Abnahme des undissoziierten Anteils mit steigendem p_H-Wert bei verschiedenen Säuren unterschiedlich ist.

Säure bzw. Verbindung	undissoziierter Anteil in % bei p_H 2	3	4	5	6	7
schweflige Säure	37	5,5	0,55	0,04	0,001	0
Sulfogruppe EH 50	63	93,9	94,8	66,7	16,7	1,9
Salizylsäure	90	49	8,6	0,94	0,094	0,0094
Ameisensäure	98	83	32	4,5	0,47	0,048
p-Chlorbenzoesäure	99	91	52	9,7	1,06	0,107
Benzoesäure	99	94	60	13	1,5	0,15
Propionsäure	99,9	99	88	42	6,7	0,71
Dehydracetsäure	100	100	95	65	15,8	1,9
Borsäure	100	100	100	100	100	100
Sorbinsäure		98	86	37	6	0,6

Stark zur Dissoziation neigende Säure, wie Ameisen- und Salicylsäure, können nur dann erfolgreich zur Konservierung verwendet werden, wenn das entsprechende Lebensmittel stark sauer reagiert. Die Ester der p-Oxybenzoesäure sind ähnlich wie Borsäure als undissoziierte Verbindungen in ihrer Wirkung unabhängig vom p_H-Wert des Systems Substrat-Konservierungsmittel und daher auch bei neutralen Produkten mit demselben Erfolg verwendbar wie bei stark sauren.

Bei den Antibiotika beeinflußt der p_H-Wert nicht so sehr die Wirksamkeit, sondern vielmehr ihre Stabilität. Als optimale p_H-Werte gelten für Tetracycline 6,1, Penicillin 6,5, Streptomycin 8,5 - 9,0 (35). Die p_H-Abhängigkeit des Aureomycin geht aus der folgenden Angabe hervor (14): Bei einer Anfangskonzentration von 12 ppm fällt die Wertigkeit der Lösung bei

p_H 4 in ca. 16 Stunden auf die Hälfte
p_H 7 " " 8 " " " "
p_H 8 " " 5 " " " "

Eiweißhaltige Nährböden verursachen keine erhöhte Inaktivierung.

6. Einfluß der Temperatur

Im Gegensatz zu den Konservierungsmitteln hängt die Stabilität der Antibiotika auch stark von der einwirkenden Temperatur ab. Nach vergleichenden Untersuchungen von SHAHANI (78) ist Terramycin weniger hitzestabil als Penicillin, Streptomycin und Aureomycin. Der Antibiotikaverlust ist z. B. in Milch, Puffer und Wasser direkt proportional der Hitzeanwendung. Die Hitzeinaktivierung der Antibiotika ist allerdings bei in Wasser aufgeschwemmter Trockenmilch auch umgekehrt proportional dem Gesamttrockensubstanzgehalt. Der Lagerverlust von Terramycin in Milch wird zum Teil auf den natürlichen Keimgehalt und die mikrobiellen Enzyme zurückgeführt, zum Teil auch Oxydationsvorgängen zugeschrieben.

Nach DORNER und LAMMER (14) verliert Aureomycin in wässriger Lösung (p_H 6,6)

bei 4° C 50 % der Anfangsaktivität nach 40 Stunden
" 20° C 50 % " " " " 10 "
" 37° C 50 % " " " " 4 "

Wird Brustmuskulatur vom Huhn nach Eintauchen in Aureomycinlösungen gekocht, so wird, wie KOHLER und Mitarbeiter (40) feststellten, das in die Mus-

kulatur diffundierte Aureomycin, wenn die Konzentration in der Eintauchlösung 100 ppm betrug, nach 15 min und bei einer Ausgangskonzentration von 1000 ppm nach 30 min inaktiviert.

Nach LORENZ (50) bleiben 10 ppm Aureomycin in Fleisch nach 5 min langer Erhitzung auf 96° C erhalten, während nach 30 min langer Erhitzung auf 96° C nichts mehr nachweisbar ist.

GRAU (23) prüfte die Thermostabilität von Aureomycin in Dosenwürstchen indirekt durch Feststellung des Keimgehaltes. So fand er in Würstchen, die ursprünglich je g Brät und ml Lake 50 ppm Aureomycin enthalten hatten, nach 40 min langer Erhitzung bei 70° C und anschließend 18-tägiger Bebrütung bei 37° C nur eine geringe Anzahl lebensfähiger Sporen, die erst in aureomycinfreien Subkulturen auskeimten.

Nach PROST (67) sollen der Wurstmasse zugesetzte Antibiotika durch Erhitzung nicht beeinträchtigt werden, in bestimmten Fällen wurde sogar eine Aktivierung beobachtet.

7. Einfluß des Substrates

Lebensmittel können auch als Ionenaustauscher wirken und zwar einmal im günstigen Sinne insofern, als z. B. Säuren, z. B. aus Kalziumpropionat, Propionsäure, frei gesetzt werden, zum andern kann aber auch eine Adsorption des Konservierungsmittels eintreten und so seine wirksame Menge verringert werden. Lebensmittel stellen ein heterogenes Medium dar, und spezifisch wirkende Stoffe können durch andere, antagonistische Verbindungen unwirksam gemacht werden.

8. Anwendung von Konservierungsmitteln

Im Rahmen dieser Arbeit interessieren Konservierungsmittel nur insofern, als sie für die Fleisch- und Fischkonservierung in Frage kommen.

a) Fleischkonservierung

Da Fleischprodukte gewöhnlich nur schwach sauer bis neutral reagieren, eignen sich zu ihrer Frischhaltung vor allem solche Konservierungsmittel, die in ihrem Wirkungsgrad weitgehend p_H-unabhängig sind, d.h. stark zur Dissoziation neigende Säuren kommen weniger in Betracht. So wurden vor allem vorgeschlagen: Benzoesäure, Oxybenzoesäure sowie deren Ester, Borsäure,

Hexamethylentetramin, Dehydracetsäure (71, 2, 80, 28), außerdem Natrium- und Kalziumsalze von Essig-, Milch-, Phosphor-, Salpeter-, Wein-, Zitronen- und Propionsäure, ferner die Kalziumsalze von Salpeter-, Phosphor- und Weinsäure, Glyzerin, Ammoniumsulfat, gasförmige Kohlensäure (93, 25).

b) Frischhaltung von Fischen
Nach PARTMANN (65) ist von den zur Fischbeeisung vorgeschlagenen bakteriziden Substanzen Formaldehyd (0,05 %) am wirksamsten. Es folgen Natriumnitrit (0,02 %) und Trypaflavin (0,05 %), Zephirol (1 %) und Tego 51 (1 %).

9. Antibiotika in der Konservierung

Auf Grund ihrer hervorragenden antimikrobiellen Eigenschaften fanden in die Nahrungsmittelkonservierung auch Antibiotika Eingang. Für Nahrungsmittel tierischer Herkunft erwiesen sich die Breitspektrum-Antibiotika als besonders geeignet, da die Verderbnisflora heterogen zusammengesetzt ist. Die Anwendung erstreckt sich in erster Linie auf Fleisch, Fisch und Huhn.

a) Antibiotika in der Frischhaltung von geschlachteten Hühnern
Nach VAUGHN (86) haben sich bei einer Lagerungstemperatur von 7,2° C Tetracycline am besten bewährt. Die Verlängerung der Haltbarkeit beträgt bis zu 3 Tagen.

JANICZEK (32) fand Penicillin zur Verlängerung der Haltbarkeit als ungeeignet. Dagegen waren Tetracyclinkonzentrationen von 10 und 20 ppm für kurze Zeit bakteriostatisch wirksam. Konzentrationen von 30, 40 und 50 ppm zeigten längeranhaltende antibakterielle Wirkung, schafften jedoch eine Disposition für starkes und überwucherndes Oberflächenwachstum von Schimmelpilzen und Hefen. Haltbarkeitsverlängerungen um 140 - 160 % werden mit 30 ppm erreicht. Noch stärkere Konzentrationen ergaben nur eine Haltbarkeitsverlängerung von 40 - 100 %. JANKE (33) beobachtete nach einer Behandlung der Hühner mit Chlortetracyclin und Lagerung in Polyäthylensäckchen bei 3° C eine Haltbarkeit von 3 Wochen ohne feststellbare Wertminderung, während Kontrollhühner vollständig verdorben waren. Als unbedingte Voraussetzung für Erfolge forderte er hygienisch einwandfreie Bedingungen bei Schlachtung und weiterer Behandlung. KOHLER und Mitarbeiter (40) fanden für die Frischhaltung von Geflügel Chlortetracyclin am

meisten geeignet. Durch 30 min langes Eintauchen in Lösungen mit 10 - 30 ppm Aureomycin wurden die Oberflächenbakterien bei einer Lagertemperatur von 3° C bis zu 21 Tagen wesentlich in ihrer Vermehrung gehemmt. Die Resorption von Aureomycin ist um so größer, je niedriger die Temperatur der Lösung ist. Die optimale Temperatur liegt bei 3° C. Chlortetracyclin (Aureomycin) kommt als "Acronize" in den Handel. Die Herstellerfirma empfiehlt seine Anwendung in Konzentrationen von 10 ppm zum Eintauchverfahren für geschlachtete Hühner (89). In USA, Japan, Kanada und Columbien ist es zu diesem Zweck zugelassen.

b) Antibiotika in der Fleischkonservierung
Eine Einspritzung von Antibiotika, insbesondere von Tetracyclinen, bei Schlachttieren vor der Schlachtung ist geeignet, die Haltbarkeit des Fleisches, insbesondere des kühlgelagerten, zu verbessern. Die bakteriostatische Wirkung der Antibiotika wird auch bei der Schnellreifung von Fleisch bei höheren Temperaturen angewandt. Bei Injektion von 6 - 12 mg Antibiotika je kg Fleisch traten innerhalb 48 Stunden, selbst bei 35° C, keine bakteriellen Veränderungen auf. Unter tropischen Verhältnissen aufbewahrtes Fleisch hielt mehrere Tage länger, wenn dem Tier vor der Schlachtung ein bestimmtes Antibiotikum injiziert worden war (91). Nach WEISER und Mitarbeiter (88) hat sich hierzu Chlortetracyclin hinsichtlich Aktivität, bequemer Anwendung und Wirkungsdauer am besten bewährt. Auch als Zusatz zu zerkleinertem Rindfleisch war es unter 6 geprüften Antibiotika am wirksamsten (21). Streptomycin, Penicillin und Bacitracin bewirkten gegenüber den Kontrollen keine Verlängerung der Haltbarkeit.

Für die Herstellung haltbarer Dosenwaren (3) verspricht die Kombination von milder Hitze und Subtilinzusatzbehandlung günstige Erfolge, denn die Sporen wichtiger Verderbserreger werden entweder abgetötet oder am Auskeimen gehindert (3). Eine zuverlässige Abtötung aller Lebensmittelvergifter wird jedoch nicht erreicht.

PROST (67) konnte Wurstmasse durch Erhitzung bei gleichzeitiger Zugabe von Penicillin und Streptomycin konservieren; Tetracycline wurden nicht geprüft. Da nach der Behandlung wohl Sporenbildner vorhanden waren, aber keine Fäulnis auftrat, nimmt PROST eine hemmende Wirkung auf die Sporenkeimung an.

c) Fischkonservierung
In der Hochseefischerei haben sich Breitspektrum-Antibiotika, insbesondere

Tetracycline zur Frischhaltung hervorragend bewährt (81, 94, 43, 46, 37, 1, 6). TARR (82) fand von 19 geprüften Antibiotika Chlortetracyclin in Form des "Acronize" am wirksamsten. Auch GIBSON und Mitarbeiter (20) beurteilten die antibiotische Wirksamkeit der Chlortetracycline gegenüber Fäulnisbakterien am günstigsten; es folgten Oxytetracyclin und Tetracyclin.

Zur Fischbeeisung wird eine Konzentration von 5 ppm Aureomycin zu Wasser empfohlen. Diese Lösung wird eingefroren und in Eisform verwendet. Ohne Einfrieren ist die Wirkung begrenzt (46). Am wirksamsten erwies sich die Zugabe unmittelbar nach dem Fang (81). Während bei Verwendung von gewöhnlichem Eis der Verderb der Fische nach etwa 14 Tagen einsetzt, verlängerte Chlortetracyclin die Haltbarkeit um weitere 7 - 8 Tage (81, 94).

d) Antibiotikarückstände in Lebensmitteln

Chlortetracyclin soll in Hackfleisch nach Zusatz von 2 ppm nach 4-tägiger Lagerung bei 10° C, in Rindskeulen bei einer Anfangskonzentration von 5 ppm nach 2-tägiger Lagerung sowohl bei 25° C als auch bei 1° C nicht mehr nachweisbar sein (88). Im Fleisch von geschlachteten Tieren, denen kurz vor der Tötung soviel Chlortetracyclin infundiert wurde, daß 2 ppm als Endkonzentration vorlagen, konnte das Antibiotikum bei einer Lagerungstemperatur von 1° C 4 Tage nach der Schlachtung nicht mehr nachgewiesen werden (88). In Lengfisch und Lachs hinterläßt ein Eintauchen in Lösungen von 10 ppm keinen nachweisbaren Tetracyclingehalt, soweit er mit einem bis zu 2 ppm empfindlichen Testverfahren erfaßbar ist (82). In der Muskulatur gewisser Fische sind außerdem Substanzen vorhanden, die auch ohne Zusatz von Antibiotika schwach positiven Ausfall mikrobiologischer Tetracyclinteste liefern. Diese Stoffe können in einer Konzentration, die 0,25 ppm Chlortetracyclin äquivalent ist, vorhanden sein (72).

Geflügelfleisch erhält nach Eintauchen in ein Kühlbad von 10 ppm eine Tetracyclinkonzentration von 2 - 3 ppm. Davon soll bei einer Lagerungstemperatur von 3° C nach 14 Tagen nichts mehr nachzuweisen sein (89).

II. Biologische Hemmstoffteste

Der Gedanke, Hemmstoffe in Lebensmitteln mit Hilfe von Mikroorganismen nachzuweisen, ist nicht neu. Er fand schon zu Beginn dieses Jahrhunderts Verwirklichung.

Das Wesen eines biologischen Hemmstofftestes besteht darin, daß man Nahrungsmittel oder einen Auszug davon mit einem geeigneten Mikroorganismus beimpft und nach ausreichender Bebrütungszeit sein Wachstum feststellt. Nach BERNAERTS (7) sind dabei zwei Gesichtspunkte besonders zu berücksichtigen:

1. Das zu prüfende Nahrungsmittel darf nur möglichst wenige Veränderungen erfahren;
2. der Prüfungsorganismus muß ein typischer Vertreter der Verderber sein, die für das bestimmte Nahrungsmittel in Betracht kommen.

BLYTH (9) schuf 1901 als erster ein Verfahren zum Nachweis von Konservierungsmitteln in der Milch. Als Testkultur verwendete er verdünnte saure Milch (Streptococcus lactis), die er zusammen mit schwach alkalischer Lackmuslösung der fraglichen Probe sowie einer hemmstoffreien Kontrollprobe zusetzte. Trat die Entfärbung der fraglichen Probe später ein als die der Kontrolle, so schloß er auf die Anwesenheit von Inhibitoren in der Milch. Die Leistungsfähigkeit dieser Methode war erheblich. So konnte er z. B. 0,005 % Borsäure, 0,05 % Salizylsäure und 0,0003 % Formaldehyd in der Milch nachweisen.

Wenige Jahre später entwickelten LÜHRIG und SARTORI (52) einen mikrobiologischen Test zur Anwendung auf dem Gebiet der Früchtekonservierung. Als Organismus diente Preßhefe, die bei Fehlen von Hemmstoffen in zuckerhaltigen Medien Zucker abbaut. Diesen Vorgang verfolgten die Autoren im polarisierten Licht. Die Empfindlichkeit des Testes befriedigte nicht.

Für zuckerhaltige Medien eignet sich der von KLUYVER (38) 1914 eingeführte Gärungstest besser. Das fragliche Substrat wird dabei mit Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) beimpft; die Vermehrung der Hefezellen läßt sich an der CO_2-Entwicklung verfolgen. Eine quantitative Bestimmung der Keimentwicklung, ebenfalls zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch, hat 1918 LIGNIERES (47) empfohlen. DRIEUX und THIERY (15) wandten das bakteriometrische Prinzip später bei der Untersuchung von Fleischkonserven an unter Verwendung von Serratia marcescens.

Während bis zum vergangenen Jahrzehnt die Entwicklung neuer biologischer Hemmstofftests nicht allzu dringlich erschien, wurden die Bemühungen in dieser Richtung in den letzten Jahren erheblich intensiviert. Den Anlaß dazu gab nicht nur die allgemeine Tendenz, den Lebensmitteln Hemmstoffe zuzusetzen, sondern vor allem die ausgedehnte Anwendung bakteriell wirksamer Stoffe in der Therapie der Tierkrankheiten. Die Antibiotika mit ihren zum

Teil vorzüglichen konservierenden Eigenschaften spielten dabei eine bedeutende Rolle. Das Hauptaugenmerk richtete sich zunächst wieder auf die Milch. Man hatte beobachtet, daß die Milch antibiotikabehandelter, mastitiskranker Kühe Fehlfabrikate in der Käseherstellung verursachte. Zum Antibiotikanachweis wurden einige Verfahren entwickelt.

Auf der acidimetrischen Methode beruht der von FLEISCHMANN (18) eingeführte Test mit Joghurtkulturen. Nach Erhitzen und Beimpfen erfolgt eine 2-stündige Bebrütung mit anschließender Titration. Tritt zwischen der Verdachtsprobe und der Kontrolle ein Unterschied von 5 oder mehr Säuregraden nach Soxhlet-Henkel auf, so besteht der Verdacht auf Penicillinzusatz. Eine Hemmung durch Penicillin gelte als gesichert, wenn ein zweiter Ansatz der fraglichen Probe mit Penase keinen Säuerungsunterschied gegenüber der Kontrolle aufweist.

MOSSEL (62, 63) hat, nachdem mit dem von ihm modifizierten Kluyver-Test (Saccharomyces cerevisiae) nur Desinfektions- und Konservierungsmittel im engeren Sinne nachgewiesen werden können aber keine Antibiotika, ein Säuretitrationsverfahren mit Aerobacter aerogenes und Streptococcus faecalis als Testorganismus vorgeschlagen.

Einen weitgehend spezifischen Antibiotikanachweis ermöglicht das Plattentestverfahren nach JAQUET und STEEG (31). Mit drei verschiedenen aber gleichzeitig angewandten Testkulturen (Microc. pyog. Nr. 4097 und 2 Bacillus cereus-Stämme) gelingt es, Penicillin, Streptomycin und Chlortetracyclin einzeln und in Kombinationen nachzuweisen.

LEBER (44) hat zum Hemmstoffnachweis in der Milch das reduktometrische Prinzip wieder aufgegriffen. Er versetzte Milch mit Säureweckern sowie Resazurinlösung und bebrütete anschließend. Wenn sich das Resazurin in der Verdachtsprobe 30 min später als in der Kontrolle entfärbt, wird auf das Vorhandensein von Hemmstoffen geschlossen.

EISENBRAND, KLAUCK und PFEIL (16) versuchten über eine Farbstoffreduktion weiterzukommen. Dabei zeigte sich, daß auch die Reduktion von Azofarbstoffen durch Milchsäurebakterien zur Feststellung von Hemmstoffen geeignet ist. Gegenüber Farbstoffen, wie Methylenblau, welche wegen ihres definierten Redoxpotentials zunächst für solche Untersuchungen naheliegen, haben die Azofarbstoffe den Vorteil, daß sie irreversibel reduziert werden, wodurch der Einfluß der Luft ausgeschaltet wird, der bei Methylenblau in einer Rückoxydation der gebildeten Leukobase besteht. Zu 20 ml abgekoch-

ter Milch werden 1 ml frische Buttermilch und 1 ml 1 %ige Lösung von Azorubin (hellrot) oder Brillantschwarz (hellblau) gegeben. Nach 3-stündiger Bebrütung bei 42° C ist das Ergebnis abzulesen. Bei ungehemmtem Wachstum der Testkeime verschwindet im Gegensatz zum gehemmten Wachstum die Färbung.

Schließlich haben NEAL und CALBERT (64) ein sehr leistungsfähiges Verfahren eingeführt, das ebenso auf Farbstoffreduktion beruht. Der Indikator 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist farblos und wasserlöslich und wird durch lebende Zellen in das rote, wasserunlösliche Formazan übergeführt. Zur Durchführung des Testes werden 10 ml Milch 5 min auf 80° C erhitzt, um natürlicherweise vorhandene Inhibine und reduzierende Keime auszuschalten, danach abgekühlt, mit 1 ml 1 : 1 verdünnter Kultur von Streptococcus thermophilus beimpft und 2 Stunden bebrütet. Anschließend setzt man 0,5 ml einer 4 %igen TTC-Lösung zu, bebrütet nochmals 30 min und liest dann das Ergebnis ab. Sind keine Hemmstoffe vorhanden, so färbt sich die Milch infolge Reduktion des TTC zu Formazan rot; bei vollkommener Hemmung bleibt die natürliche Farbe der Milch erhalten. Dazwischen sind je nach Hemmstoffgehalt alle Übergänge möglich.

KOTTER und MUSPACH (41) haben dieses Verfahren aufgegriffen und für die Untersuchung von Trockenmilch modifiziert.

Um den Hemmstoffnachweis bei einer Reihe anderer Lebensmittel hat sich besonders MOSSEL verdient gemacht, indem er den bereits erwähnten Kluyver-Test für viele Anwendungsbereiche modifizierte. Nach seiner Auffassung (60) muß bei einer Konservenprüfung zugleich auch festgestellt werden, ob die Haltbarkeit der Ware nicht auch durch Zugabe von Konservierungsmitteln oder Antibiotika unterstützt worden ist.

Die bis jetzt entwickelten klassisch-chemischen Analysenmethoden und sogar die modernen Methoden, wie Chromatographie und Spektographie, seien unzureichend. Angesichts der großen Verschiedenheit der in Frage kommenden Stoffe wäre nämlich der Zeitaufwand für die regelmäßige Untersuchung der Lebensmittel ungeheuerlich. Dazu komme, daß eine Gruppe von Hemmstoffen grundsätzlich nicht auf chemischem Wege nachzuweisen sei, weil man die Struktur dieser Stoffe nicht kenne: es handle sich hier um gewisse, zum Teil in den Lebensmittelfabriken selbst hergestellte Antibiotika. Das gesteckte Ziel der notwendigen Überwachung sei jedoch durch Anwendung mikrobiologischer Methoden zu erreichen. MOSSEL (58) modifizierte den Kluyver-Test für Limonade, Bier, Marmeladen, Fleischwaren, auch gepökel-

te Fleischwaren, Milch (siehe oben), Speiseeis und Margarine. Da die Testkultur (Bäckerhefe) auch in stark saurem Milieu gutes Wachstum zeigt, eignet sich die Methode besonders zum Nachweis von solchen Konservierungsmitteln, die bei hoher Wasserstoffionenkonzentration ihr Wirkungsoptimum haben. Bei Fleisch- und Fischwaren (58, 59, 61) extrahiert MOSSEL einen Teil der zerkleinerten Probe mit Weinsäure, einen anderen mit Natronlauge. Die doppelte Extraktion ist erforderlich, um sowohl im sauren Medium lösliche Konservierungsmittel, wie Borsäure, als auch alkalisch lösliche, wie Bromessigsäurederivate, zu erfassen. Beide Extrakte werden dann auf p_H 3 eingestellt und 1 min bei 80° C pasteurisiert. Zu den Extrakten werden hierauf unter sterilen Bedingungen Hefeextrakt und Dextroselösung gegeben und dann auf p_H 4 eingestellt. Anschließend erfolgt die Beimpfung mit Bäckerhefe. Im Einhorn-Gärröhrchen werden die Ansätze schließlich 24 - 30 Stunden bei 24° C bebrütet und dann das Gasvolumen abgelesen. Die Nachweisgrenzen in Fleischwaren werden wie folgt angegeben: Bromessigsäure 2 - $5x10^{-3}$ %, Borsäure $5x10^{-1}$ %; in Fleischwaren: Hexamethylentetramin $1x10^{-1}$ % (58).

Antibiotika sind, wie bereits erwähnt, mittels des Hefegärtestes nicht nachzuweisen. Der Verfasser wendet dafür entweder den Diffusionstest nach dem Prinzip von HEATLY (24) - MORLEY (57) an oder die azidimetrische Technik nach BAETSLE (5).

Auch BERNAERTS (7) verwendet für den Konservierungsmittelnachweis in Marmelade Hefen als Testmikroben, und zwar den Stamm Saccharomyces rouxii. Bei völliger Hemmung der Gasbildung schließt er mit Sicherheit auf die Anwesenheit von natürlichen (Blaubeeren!) oder zugesetzten Hemmstoffen. Ein Gasvolumen unter 50 % des Minimalwertes ist bereits als positives Resultat zu betrachten. Er hat damit folgende Minimalkonzentrationen nachweisen können: Benzoesäure 0,02 %, Salizylsäure 0,02 - 0,03 %, Monobromessigsäure 0,0004/6 %.

CORETTI (12) prüfte den Kluyver-Mossel-Test auf Brauchbarkeit. Von etwa 100 nach diesem Verfahren untersuchten Dosenschinken, Dosenwürstchen und anderen Fleischwaren sei mit dieser Methode jedoch in keinem Fall ein sicherer Nachweis zu führen gewesen, obwohl in einzelnen Fällen der Konservierungsmittelzusatz bekannt war oder nachträglich chemisch nachgewiesen wurde. CORETTI zeigte, daß die mit der Gärmethode nachweisbaren Mindestmengen an Konservierungsmitteln ziemlich hoch liegen.

Drei entscheidende Nachteile schränken also die Verwendungsmöglichkeit des Gärtestes ein: Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika, ungenügende

Empfindlichkeit gegenüber sonstigen Hemmstoffen und zu großer Zeitaufwand, nachdem öfters ein rascher Überblick gewünscht ist.

Die von NEAL und CALBERT (64) in die Milchuntersuchung eingeführte Farbreaktion mittels TTC erschien KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (42) auch für den Hemmstoffnachweis in Fleisch- und Fischwaren geeignet, nachdem KOTTER und MUSPACH dieses Verfahren zuvor schon bei der Prüfung von Trockenmilchpräparaten verwendet hatten. Den Anlaß zu diesen Untersuchungen gaben einerseits vermehrte Anwendung von Hemmstoffen vor allem in Halbkonserven, andererseits die Behandlung von Schlachttieren mit Antibiotika. Dadurch ergaben sich nicht nur für die Lebensmittelüberwachung, sondern auch für die bakteriologische Fleischuntersuchung neue Gesichtspunkte.

Verschiedene Autoren (48, 34, 11) haben zu diesem Problem Stellung genommen und gezeigt, daß die bakteriologische Fleischuntersuchung beeinträchtigt wird, wenn die Tiere vor der Schlachtung mit Antibiotika behandelt werden. So wurde beobachtet, daß Milzbrandbazillen und Salmonellen bei wirksamen Antibiotikakonzentrationen wesentlich langsamer wachsen oder eventuell auf den üblichen Nährböden nach der herkömmlichen Bebrütungszeit noch nicht wahrzunehmen sind (11).

Um in Verdachtsfällen bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung dennoch zu einem sicheren Urteil zu gelangen, wird u. a. eine gleichzeitig stattfindende Antibiotikabestimmung vorgeschlagen (11).

Davon ausgehend haben KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (42) einen Schnelltest mit TTC in Verbindung mit einem geeigneten Testorganismus geschaffen. Als geeigneten Keim verwendeten sie einen Staphylococcus aureus-Stamm (ATCC Nr. 6538-P), dessen Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und Konservierungsmitteln besonders ausgeprägt ist. Die Durchführung des Testes erfolgt in der Weise, daß ein Teil der Niere fein zerkleinert, mit 2 Teilen Peptonwasser (1 % Pepton, 1 % Dextrose, 0,5 % NaCl) versetzt und gut durchmischt wird. Um originäre Reduktasen des Organs und eventuell vorhandene Keime auszuschalten, wird die Probe 5 min auf 80° C erhitzt. Hierauf wird der Extrakt filtriert oder zentrifugiert, die eine Hälfte davon auf p_H 6,5, die andere auf p_H 8 eingestellt, letzteres, um auch Antibiotika zu erfassen, die im alkalischen Bereich optimal wirken, wie z. B. Streptomycin. Dann werden die Ansätze in Reagenzgläsern mit einer etwa 18 Stunden alten Kultur des Teststammes beimpft und mit TTC versetzt. Nach weiteren 30 min Bebrütung liegt das Ergebnis vor. Bei hemmstoffreien Extrakten stellt sich in-

tensive Rotfärbung ein, bei Anwesenheit von Hemmstoffen färbt sich der Ansatz schwach oder überhaupt nicht an. Die von den Autoren angeführten Ergebnisse zeigen, daß sich der Test für den vorgesehenen Anwendungsbereich gut eignet. Es soll jedoch darauf hingewiesen werden, daß ein Farbtest nur dann zuverlässige Werte ergibt, wenn die Eigenfarbe des Extraktes nicht zu stark ist.

CORETTI (13) wählte zum Nachweis von Hemmstoffen in Gelatine die Agarlochtestmethode. Als Testkeim verwendete er Bac. cereus. Der Agar (p_H 6,3) enthielt 0,1 % Dextrose. In die Stanzlöcher gab er 10 %ige Gelatinelösung und bebrütete bei 25° C. Als geringste nachweisbare Menge der einzelnen Konservierungsmittel gibt er folgende Konzentrationen (in %) an:

Benzoesaures-Na	0,5	p-Oxybenzoesäure	0,25
Sorbinsäure	0,1	Monochloressigsäure	0,05
Monobromessigsäure	0,001		

Von 85 von CORETTI untersuchten Gelatineproben erwiesen sich 46 frei von Hemmstoffen; in 15 Proben gelang ein chemischer Hemmstoffnachweis, unter diesen 15 waren 14 auch beim biologischen Hemmstofftest positiv. Außerdem ergab ein Viertel der Proben (23) bei der chemischen Untersuchung keine Hemmstoffe, wohl aber bei der mikrobiologischen.

Neuerdings haben v. d. MIJLL DEKER, MOSSEL und Mitarbeiter (54) einen speziell für den Antibiotikanachweis geschaffenen Test beschrieben, der für die Untersuchung von Fleisch, Milch und Eiern gleichermaßen geeignet sein soll. Es handelt sich um einen Agartest mit der Besonderheit, daß der Agar mit den fraglichen Lebensmitteln vermischt wird. Diese Modifikation führt zu einer Empfindlichkeitssteigerung gegenüber dem Agar-Lochtest und ermöglicht den Nachweis von Tetracyclinkonzentrationen in der Größenordnung von 1 ppm des betreffenden Nahrungsmittels, die nach den Autoren unter den in der Praxis verwendeten Konzentrationen liegen. Das p_H des Agar liegt bei 7, daher werden Konservierungsmittel, die nur im sauren Bereich wirken, nicht erfaßt. Als Testkeim diente der besonders tetracyclinempfindliche Stamm Staphylococcus aureus Oxford, als Indikator TTC.

Unspezifisch ist auch der von TERPLAN (84) entwickelte Katalasetest. Sein Prinzip beruht darauf, daß man den Extrakt eines fraglichen Nahrungsmittels mit katalasebildenden Keimen (z. B. Staphylococcus aureus ATTC Nr. 6583-P) beimpft, bebrütet und mit H_2O_2 versetzt und die Katalasebildung mit derjenigen einer hemmstoffreien Probe vergleicht. Die Katalaseaktivität wird volumetrisch ermittelt (Katalaser).

III. Testmikroben

Bei der von KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (42, 84) verwendeten Testkultur handelt es sich um den Stamm Staphylococcus aureus ATTC Nr. 6583-P. Die Gattung Staphylococcus gehört zu der Familie der Micrococcaceae, also zu den grampositiven Kugelmikroben mit teils pathogenen, teils apathogenen Eigenschaften. Pathogene Staphylokokken trugen früher die zusätzliche Bezeichnung "pyogenes". Mikrokokken wachsen gut auf den gebräuchlichen Nährböden. Auf der Agaroberfläche bilden sie runde, dicke, pigmenthaltige Kolonien; Bouillon wird stark getrübt, zuweilen mit Bildung eines Bodensatzes. Die Mikrokokken gehören zu den am meisten widerstandsfähigen Keimen unter den nicht sporenbildenden Bakterien. Dem direkten Sonnenlicht können sie mehrere Tage widerstehen, auch gegen Eintrocknen zeigen sie bedeutende Resistenz, erst eine halbstündige Erhitzung bei 70 - 80° C vermag sie zu vernichten. Ihre optimale Wachstumstemperatur beträgt 37° C (72). In Bouillon vermehren sie sich noch bei einem Kochsalzgehalt von 12 - 20 % (39, 53). In der Lebensmittelüberwachung haben sie als Erreger von Lebensmittelvergiftungen Bedeutung (45, 66, 72); sie finden in fast allen Nahrungsmitteln Wachstumsbedingungen.

Bei der Übertragung ruhender Mikrobenzellen in ein neues Substrat verstreicht nach RAIBLE (68) und KLEIN (35) erst eine gewisse Zeit, bis sie sich zu vermehren beginnen, die sogenannte Latenzphase. In diesem Stadium spielen sich in erster Linie intrazelluläre Prozesse ab, der Stoffwechsel wird dem neuen Substrat angepaßt und kommt dann allmählich in Gang. Die Zelle nimmt an Größe zu. Es schließt sich die Beschleunigungsphase an, in welcher die Teilungsgeschwindigkeit laufend zunimmt. Die logarithmische Vermehrungsphase ist die nächste Stufe, in welcher sich die Zellzahl durch stetige Verdoppelung rasch erhöht. Nach Erreichen einer gewissen von verschiedenen Faktoren begrenzten Zelldichte tritt die Verzögerungsphase mit abnehmender Vermehrungsgeschwindigkeit ein. In der nun folgenden stationären Phase unterbleibt jegliches Wachstum. Schließlich kommt es in der Phase der Keimabnahme zum allmählichen Absterben der Kultur. Von den genannten Phasen können Latenz- und Beschleunigungsphase u.U. fehlen, die Verzögerungsphase ist häufig so kurz, daß sie nicht erkannt wird.

Nach Überschreiten der logarithmischen Phase treten Desorganisation und Umorganisation in den Enzymsystemen der lebenden Zelle auf. So kommt es, daß beim Überimpfen auf frisches Substrat die Induktionsphase um so länger wird, je älter die Ausgangspopulation ist.

Die Wachstumsphasen der Testkultur erlangen bei deren Verwendung zur Prüfung hemmstoffhaltiger Nährböden besondere Bedeutung. KLEIN (35) hat die Beziehungen zwischen Wachstumsstadien verschiedener Mikrobenstämme und der Wirkung unterschiedlicher Antibiotikakonzentrationen im Nährsubstrat eingehend geprüft. Danach ist die antibakterielle Wirkung einer Substanz in ihrer Intensität grundsätzlich abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der Kultur. Die antibakterielle Wirkung ist um so stärker, je höher der Assimilationsumsatz der Kultur zur Zeit der antibiotischen "Attacke" ist. So stellte KLEIN an Sporenbildnern der Subtilisgruppe, denen er während der logarithmischen Phase verschiedene Lösungen Chloramphenicol zusetzte, fest, daß bei 0,5 ppm und 1,5 ppm deutliche Wachstumsverlangsamung, bei 3,3 ppm vollkommene Ruhe, bei 33 ppm relativ schnell verlaufende Absterbeprozeße eintraten. Auf gänzlich ruhende Keime in stickstoffreier Suspension hat Chloramphenicol überhaupt keine Wirkung; in stickstoffreien Medien können nämlich die meisten Keime nicht assimilieren und daher auch nicht wachsen, d.h. diese Keime sind für Chloramphenicol und ähnlich wirkende Hemmstoffe nicht angreifbar.

Das Schicksal der Testmikroben in hemmstoffhaltigen Medien hängt auch von der Dichte der Population ab. So wird nach KLEIN eine Population von empfindlichen Erregern durch genügend hohe Konzentrationen von Tetracyclinen dann abgetötet, wenn die Keimdichte sehr klein ist; bei großer Keimdichte führt die gleiche Konzentration lediglich zur Bakteriostase.

Der Nährboden beeinflußt die Empfindlichkeit der Kultur insofern, als stickstoffhaltige Substanzen, z.B. Pepton, die Assimilationsvorgänge einleiten oder schon vorhandene beschleunigen.

IV. Katalase

THÉNARD (85) entdeckte 1818 das Wasserstoffsuperoxyd (Hydroperoxyd). Es fiel ihm auf, daß es durch pflanzliche und tierische Zellen zersetzt wird. SCHÖNBEIN, 1863, (76) befaßte sich damit eingehender. Er betrachtete die Katalyse des Hydroperoxyds als Urbild für alle Gärungsvorgänge. JACOBSON, 1892, (30) sprach sich gegen diese Ansicht aus, da er besondere Fermente als Ursache für die Hydroperoxydspaltung nachweisen konnte. Nach seiner Auffassung handelt es sich dabei um eine allgemeine Eigenschaft wasserlöslicher Fermente, denen jeweils eine spezifische Fermententwicklung und eine davon

unabhängige peroxydative Komponente zukommt. GOTTSTEIN (22) fand die Fähigkeit der Peroxydspaltung auch bei Mikroorganismen (1893). 1903 prägte LOEW (49) den Begriff Katalase. Erst 1930 gelang es ZEILE und HELLSTRÖM (90), die Häminnatur der Katalase spektrometrisch nachzuweisen.

Die Katalase ist ein Hämenzym, das aus einem thermostabilen, unspezifischen Coferment (prosthetische Gruppe) und einem thermolabilen, weitgehend artspezifischen Apoferment (Protein) besteht (8). Sie ist wasserlöslich, koagulierbar und wird durch bestimmte chemische Substanzen gefällt. Der Hitzekoagulation geht eine Inaktivierung voraus; das Koagulum zeigt mucinartige Beschaffenheit (87). Der Eisengehalt des Cofermentes beträgt etwa 0,09 %, das Molekulargewicht 240 000, woraus geschlossen werden kann, daß 1 Katalasemolekül 4 prosthetische Gruppen enthält. Das Eisen der prosthetischen Gruppen ist 3wertig. Die Katalase findet sich im gesamten Bereich der belebten Natur (22, 76). Im Pflanzenreich tritt sie in relativ hohen Konzentrationen bei Meerrettich, Hülsenfrüchten und Getreidekörnern auf, in gesteigertem Maße bei deren Keimlingen. Im Tierkörper erreichen Blut und Leber die höchsten Konzentrationen.

Der Katalasegehalt der verschiedenen Mikroorganismen schwankt erheblich. Als allgemeine Regel kann gelten, daß aerobe Bakterien meist viel, fakultativ anaerobe weniger, obligate Anaerobier keine Katalase bilden (8). Anaerob gezüchtete Bakterien sind wesentlich katalaseärmer als aerob gewachsene derselben Art (79). Eine Ausnahme unter den Aeroben bilden Laktobazillen, Pneumokokken und Streptokokken, bei denen zum Teil der Nachweis eigener Wasserstoffsuperoxydbildung erbracht ist. Dagegen zeigen Staphylokokken eine außerordentlich starke Katalase, die an Aktivität sogar die des Blutes übertrifft (8).

Die Katalase ist eines der wichtigsten Zellstoffwechselfermente; ihre Funktion hängt eng mit der Zellatmung zusammen. Sie kommt überall dort vor, wo die lebende Zelle ihre Energie aus der Sauerstoffatmung gewinnt und dient als Schutzeinrichtung für komplizierte Fermente und Fermentsysteme. Man kann daher sagen, daß mit der Zerstörung der Katalase das Leben der Zelle nicht mehr zu erhalten ist (8). Für die Schutzfunktion des Fermentes spricht u. a. die Beobachtung, daß katalasepositive Bakterien gegen UV-Strahlen bedeutend resistenter sind als negative, da der schädliche Einfluß der vermutlich bei der Bestrahlung gebildeten Peroxyde durch die Katalase gemildert wird. Die oben erwähnte Ansicht, die Katalasezerstörung gehe mit einer Zerstörung der Zelle einher, scheint nicht für jeden Fall zuzutreffen. SCHLUNK (75)

prüfte nämlich das Wachstum von Kulturen, denen er zuvor so lange Peroxydlösung zugesetzt hatte, bis keine Schaumbildung und kein Blasensteigen mehr auftraten. Dabei stellte er jedoch fest, daß auch nach Versetzen mit Hydroperoxyd noch ein Wachstum in Gang kam, am besten bei den Bakterienstämmen, die Wasserstoffsuperoxyd am stärksten zersetzt hatten.

Den Wirkungsmechanismus der Katalase versuchte WIELAND mit seiner Dehydrierungstheorie zu erklären. Danach besteht die Fermentwirkung in einer Aktivierung des Wasserstoffs, der dann gleich nascentem Wasserstoff an geeignete Wasserstoffakzeptoren abgegeben wird. Dabei sollen zwei Wasserstoffatome mit molekularem Sauerstoff als Wasserstoffakzeptor zu Wasserstoffsuperoxyd zusammentreten. Das entstandene Wasserstoffsuperoxyd soll, da es nicht als Akzeptor zu dienen vermag, durch Katalase zerlegt werden, die durch ihre Wirkung einerseits neuen Sauerstoff bildet und andererseits das für die Zelle giftige Peroxyd beseitigt.

Nach THEORELL und CHANCE (83) verläuft die Katalasereaktion je nach vorliegendem Peroxyd verschieden. In vivo sollen die Katalasen im allgemeinen als Peroxydasen wirken, d.h. Sauerstoff aus Peroxyden auf Wasserstoff übertragen. Hydroperoxyd bildet sich bei biologischen Oxydationsvorgängen nur in geringen Mengen. Durch Reaktion mit der in großem Überschuß vorhandenen Katalase entsteht ein Zwischenprodukt, das seinerseits mit den entsprechenden Substanzen reagiert. Die katalytische Reaktion selbst, also die Spaltung des Wasserstoffperoxyds in H_2O und O_2, kommt in vivo nicht zustande, da das dazu notwendige Mengenverhältnis Peroxyd : Katalase nicht erreicht wird.

Entsprechend der Artspezifität ihres Eiweißkörpers zeigen die einzelnen Katalasearten zum Teil erhebliche Unterschiede gegenüber Hitzeeinwirkung. Dabei spielen ungünstiges p_H und geringe Konzentrationen des Enzyms eine entscheidende Rolle im Sinne einer Inaktivierung. Temperaturen von 60 - 65° C zerstören Milchkatalase in 30 min (36). Zur Inaktivierung der Blutkatalase sind bei Menschenblut 72 - 73° C erforderlich, bei Hundeblut 50° C, bei bestimmten Vogelarten genügt sogar Zimmertemperatur (8). Bei Bakterien reicht im allgemeinen ein 15 min langes Erhitzen auf 80° C zur Zerstörung des Fermentes aus; für die Katalase des Staphylococcus aureus liegt der kritische Bereich bei der gleichen Hitzeeinwirkung. Bei Sporen dagegen bleibt selbst eine Erhitzung auf 100° C ohne Wirkung (79).

Das Minimum der Wasserstoffionenkonzentration für die Katalasewirksamkeit von Staphylokokken (albus und aureus) liegt unterhalb p_H 9,1, das Optimum

zwischen p_H 8 und p_H 6,5, das Maximum über p_H 3 (79).

Die Zerstörung des Enzyms durch Hydroperoxyd nimmt mit steigender Temperatur zu. Sie hängt in noch stärkerem Maße vom Grad der Pufferung ab. Bei ausreichender Pufferung ist die Katalasewirkung der Enzymkonzentration direkt proportional und unabhängig von der Konzentration des Wasserstoffsuperoxyds. Bei unzulänglicher Pufferung nimmt die Wirkung der Katalase mit steigender Peroxydkonzentration ab (56).

JACOBSON (30) prüfte die Abhängigkeit der Katalaseaktivität von der Anwesenheit bestimmter chemischer Verbindungen. Er stellte fest, daß Säuren, Laugen und Salze, die er in großer Anzahl untersuchte, Einfluß auf die Katalase haben, meist hemmend, selten fördernd. So fand er bei Zusatz von 0,1 % Alkali zu den Fermentlösungen eine Beschleunigung der Sauerstoffentwicklung, über 0,1 % eine Verlangsamung und ein Erlöschen dieser Fähigkeit. Nitrate schwächten in der Konzentration von 1 - 2 % das Enzym, ebenso Natriumnitrit.

Der Katalasenachweis kann direkt auf spektrometrischem Wege (96) erfolgen oder indirekt anhand der Peroxydzersetzung. Beim indirekten Verfahren ergeben sich zwei Möglichkeiten: man beobachtet entweder das Freiwerden des Sauerstoffs oder mißt die nicht zersetzte Peroxydmenge.

Zur Prüfung von Bakterienkulturen auf Katalasebildungsvermögen genügt es, nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd zur Kultur auf auftretendes oder ausbleibendes Aufschäumen zu achten. BUJWID (10) empfiehlt zu diesem Zweck, auf einen Objektträger einzelne Tröpfchen von 1 %iger Peroxydlösung zu geben und darin "winzig" kleine, einheitliche Mengen der fraglichen Kolonien zu zerreiben. Für eine eventuell erforderliche scharfe Differenzierung einzelner Katalasebildner kommt die Betrachtung im Dunkelfeld oder im Phasenkontrastmikroskop in Frage.

Das Auftreten von Bläschen bei der Zersetzung von Peroxyd macht sich auch SCHÖNBERG (77) zum Nachweis einer ausreichenden Erhitzung von bedingt tauglichem Fleisch zunutze: ein haselnußgroßes Stück wird mit 3 %iger H_2O_2-Lösung übergossen; bei Gegenwart von Katalase entstehen nach wenigen Sekunden Bläschen von molekularem Sauerstoff. Ein ähnliches Verfahren wird zur Feststellung bestimmter Mängel und Zustände der Milch angewandt (36). Ebenfalls auf dem Gebiete der Milchuntersuchung wird eine sogenannte Schnellkatalaseprobe (36) empfohlen. Man füllt dabei ein graduiertes Reagenzglas zu Dreiviertel mit der fraglichen Milch und gibt 2 - 3 %ige Wasser-

stoffsuperoxydlösung dazu (eventuell auch Thybromollösung). Das Glas wird sodann mit einem von einem dünnen Röhrchen durchbohrten Stopfen verschlossen, der Inhalt durch Stürzen vermischt und das Reagenzglas mit dem Stopfen nach unten aufgestellt. In katalasepositiven Fällen steigen im Glas Schaumblasen auf und verdrängen einen Teil der Milch aus dem Reagenzglas. Die optimale Temperatur beim Ablauf der Katalasereaktion beträgt 25° C (20 - 37° C). Zur Ermittlung genauer Katalasewerte werden bei der Milchuntersuchung die Katalaser nach LOBECK, GERBER usw. verwendet (36), bei denen durch die Sauerstoffbildung nicht katalasehaltiges Gemisch wie bei den einfachen Katalaseröhrchen nach EHRLICH, sondern Wasser aus einem Meßröhrchen verdrängt wird.

Eine weitere Möglichkeit des indirekten Katalasenachweises besteht in der Bestimmung des nicht zersetzten Hydroperoxyds. Dies kann jodometrisch oder oxydimetrisch im engeren Sinne (4) geschehen. Die Nachteile dieser Methoden liegen einmal im erhöhten Arbeitsaufwand gegenüber der gasvolumetrischen Bestimmung des Sauerstoffs, zum anderen in der Abhängigkeit von der Eigenfarbe des Untersuchungsmaterials.

C. Eigene Untersuchungen

I. Allgemeines zur Versuchsanordnung

Der Katalase-Hemmstofftest beruht auf dem Prinzip, daß eine Wachstumshemmung der katalasebildenden Testkeime indirekt durch den aus Wasserstoffperoxyd freigesetzten Sauerstoff gemessen werden kann. Da der Test auch als Routinemethode gedacht ist, muß der Arbeits- und Materialaufwand möglichst einfach sein. Es wurde daher auf den einfachen Kataläser zurückgegriffen, wie er in der Milchuntersuchung zur Schnell-Katalaseprobe (36) verwendet wird. Dieser besteht aus einem über 10 ml graduierten, etwa 15 ml fassenden Reagenzglas, in dem das mit Testkultur versetzte Nährsubstrat bebrütet wird. Nach der Bebrütungszeit wird H_2O_2-Lösung zugesetzt und das Röhrchen mit einem Gummistopfen verschlossen, der von einem sehr dünnen und kurzen Glasröhrchen durchbohrt ist, welches den Stopfen auf beiden Seiten nur um wenige Millimeter überragt. Das Reagenzglas wird nun zweimal gestürzt und mit dem Stopfen nach unten in einen Reagenzglasständer gestellt, so daß Flüssigkeit abtropfen kann. Vor der im allgemeinen rasch einsetztenden Gasbildung muß die bereits im Reagenzglas befindliche Luftmenge abgelesen und notiert werden, um sie dann nach der Ablesung des Endwertes in Abzug bringen zu können. Bei Anwesenheit von Katalase verdrängt der aus dem Peroxyd abgespaltene Sauerstoff Flüssigkeit aus dem Reagenzglas. Ist die Peroxydspaltung beendet, so wird der Flüssigkeitsspiegel ein zweites Mal abgelesen und so die Menge des gebildeten Sauerstoffes bestimmt. Es empfiehlt sich, das Röhrchen vor dem Ablesen leicht zu erschüttern, damit die häufig in großer Zahl an dem Glas haftenden Gasbläschen aufsteigen und mitgewertet werden können. Da das Sauerstoffvolumen unter gleichen Bedingungen gewissen Schwankungen unterliegt, setzt man je Probe 3 Röhrchen an, um einen zuverlässigen Mittelwert zu erhalten.

Da der Katalase-Hemmstofftest einen Ablauf mehrerer biologischer und biochemischer Vorgänge darstellt, galt es zunächst die optimalen Bedingungen zu ermitteln, die bei seiner Anwendung beachtet werden müssen und die wesentlich durch Testmikroben, Nährboden, p_H-Wert, Verdünnung und Alter der Gebrauchskultur, Bebrütungsart und -dauer sowie H_2O_2-Lösung beeinflußt werden. Der Test mußte aber auch den verschiedenen Hemmstoffgruppen angepaßt werden.

II. Untersuchungen zur Ermittlung optimaler Voraussetzungen für die Durchführung des Katalase-Hemmstofftestes

1. Testmikroben

Für die Versuche wurde ein Staphylococcus aureus-Stamm der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 6538-P) verwendet, der sich in früheren Untersuchungen des Instituts (42) vielen Hemmstoffen gegenüber als sehr empfindlich erwiesen hatte. Außerdem war festgestellt worden, daß er wie alle Mikrokokken reichlich Katalase bildet.

2. Nährboden

Staphylokokken sind anspruchslose Keime, die auch auf gewöhnlichen Nährböden wachsen. Züchtung und Aufbewahrung des Teststammes erfolgen auf Nähragar. Die Keime können allerdings vom festen Nährboden weg nicht direkt für den Test eingesetzt werden, da sie dort offenbar in einem weniger aktiven Zustand vorliegen und relativ lange Zeit beanspruchen, bis sie in das für den Test notwendige Stadium der raschesten Vermehrung gelangen (logarithmische Wachstumsphase). Um dies zu erreichen, läßt man die Keime Bouillonpassagen durchlaufen. Bei einfacher Passage erreicht die Kultur erfahrungsgemäß die für den Test erforderliche Aktivität noch nicht. Vermutlich hängt diese Erscheinung mit der allmählichen Gewöhnung an den flüssigen Nährboden zusammen. Wird eine Kultur nach einmaliger Bouillonpassage zum Test verwendet, so ist ihr Wachstum immer noch gering und unregelmäßig. Nach zwei- oder dreimaliger Bouillonpassage mit jeweils 22- und 24stündiger Bebrütung genügt die Kultur den Anforderungen des Testes. Die auf diese Weise gezüchtete Gebrauchskultur zeichnet sich durch größere Empfindlichkeit und gleichmäßige Keimverteilung aus. Die Bouillonkultur wird nun verdünnt, worauf jedoch später noch eingegangen wird, und von dieser Verdünnung 1 ml zu 9 ml des fraglichen Substrates oder Extraktes zugegeben.

Da man bestrebt sein muß, den in einem Lebensmittel vorhandenen Hemmstoff so wenig wie möglich zu verdünnen, wäre der Idealfall, das Lebensmittel, wie das bei Milch möglich ist, als Nährsubstrat zu verwenden. Bei festen Lebensmitteln ist dies nicht möglich, so daß zunächst eine Extraktion erfolgen muß, die man am zweckmäßigsten mit einem flüssigen Nährmedium vornimmt, so daß der Extrakt dann mit dem Testkeim beimpft werden

kann. Nährbouillon ist zwar dazu wohl die optimale Nährlösung, jedoch hat sich gezeigt, daß dextrosehaltiges Peptonwasser (1 % Pepton, 1 % NaCl, 1 % Dextrose) ebenfalls geeignet ist. Konzentrationen der einzelnen Substanzen über 1 % führen zu keiner zusätzlichen Steigerung des Wachstums, wenn man vom Kochsalz absieht, das bei dieser kurzen Bebrütungsdauer mit steigender Konzentration bis zu 3 % geringe Aktivierung bewirkt. Im Hinblick auf die geringgradige Steigerung und vor allem auf die Möglichkeit, daß aus kochsalzhaltigen Lebensmitteln zusätzlich NaCl in den Extrakt diffundieren kann, wurde die 1 %ige Konzentration aber als ausreichend erachtet. Peptonwasser steht als Nährlösung bei der kurzen Bebrütungszeit, wie sie der Test verlangt, der Nährbouillon nur wenig nach und ist, da es leicht hergestellt werden kann, jener vorzuziehen. Als Nährboden für die Keimpassage befriedigt es jedoch nicht.

3. Bedeutung des p_H-Wertes

Das mikrobielle Wachstum hängt wesentlich von der Wasserstoffionenkonzentration ab. Das optimale p_H liegt für Staphylokokken bei p_H 7,2 - 7,5. Zum sauren Bereich hin erfolgt stetige, jedoch zunächst geringe Abnahme der Vermehrungsrate. Gemessen an der Katalaseaktivität (Tab. 1) beträgt das Wachstum des verwendeten Stammes bei p_H 5 noch etwa 75 % des bei p_H 7,5 notierten. Bei p_H-Werten unter 5,0 sistiert die Katalaseaktivität bald.

Tab. 1 Abhängigkeit der Staphylokokken-Katalaseaktivität vom p_H

p_H-Wert	Katalaseaktivität in % (bezogen auf p_H 7,5)
7,5	100
7,0	103
6,5	100
6,0	90
5,5	80
5,0	75

4. Verdünnung und Alter der Gebrauchskultur

Es hat sich als notwendig erwiesen, die Testkultur vor Beimpfung des fraglichen Extraktes zu verdünnen. Setzt man nämlich einwandfrei dosierbare Mengen z. B. 1 ml unverdünnter Kultur zu, so wird damit allein schon eine Katalasemenge ins Röhrchen verbracht, die für sich so viel O_2 abspaltet, daß nahezu die gesamte Flüssigkeit verdrängt wird. Der Zusatz geringerer Mengen, z. B. 0,1 oder 0,05, läßt sich dagegen mit den gebräuchlichen Pipetten nur relativ ungenau dosieren, so daß dadurch größere Schwankungen bedingt würden. Die Kultur wird deshalb vorher mit Nährbouillon oder Peptonwasser verdünnt.

Die Auswahl des optimalen Verdünnungsgrades wurde nach zwei Gesichtspunkten getroffen: a) die mit der verdünnten Kultur ins Substrat übertragene Katalasemenge mußte im Verhältnis zu der nach der Bebrütung entstandenen Katalase möglichst klein sein; b) es war festzustellen, ob der Verdünnungsgrad sich auch auf die Empfindlichkeit des Testes bei Anwesenheit von Hemmstoffen auswirkt.

Zu a): Um das Verhältnis der mit der Impfmenge übertragenen Katalase zu der nach der Bebrütung entstandenen zu ermitteln, wurde folgender Versuch durchgeführt: Die Testkultur wurde 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20 verdünnt und von jeder Verdünnung 2 Röhrchen beimpft, die je 9 ml Peptonwasser enthielten. Zum ersten Röhrchen jeder Verdünnung wurde sofort und zum zweiten nach 3stündiger Bebrütung je 3 ml einer 2 %igen H_2O_2-Lösung zugegeben. Die Gasbildung wurde jeweils 1 Stunde nach der Peroxydzugabe abgelesen und die Gasmenge der unbebrüteten zu der bebrüteten Probe ins prozentuale Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2 Vergleich der Katalaseaktivitäten unbebrüteter und bebrüteter Proben mit gleicher Keimeinsaat

Kulturverdünnung	O_2-Bildung (in ml) in Ansätzen		Katalaseaktivität der unbebrüteten Proben in % derjenigen der bebrüteten
	unbebrütet	bebrütet	
1 : 20	1,7	7,9	21
1 : 10	3,8	8,5	45
1 : 5	5,4	9,3	58

Aus Tabelle 2 ist zu entnehmen, daß mit steigender Keimmenge in der Kulturverdünnung das Verhältnis der Katalaseaktivitäten von unbebrüteten und bebrüteten Proben immer enger wird. Die überimpfte Keimmenge muß andererseits aber auch so groß sein, daß schon nach kurzer Bebrütungszeit eine deutliche Katalaseaktivität vorhanden ist. Diesen Anforderungen entspricht die Verdünnung 1 : 20; weitere Verdünnungen erwiesen sich als nicht mehr ausreichend.

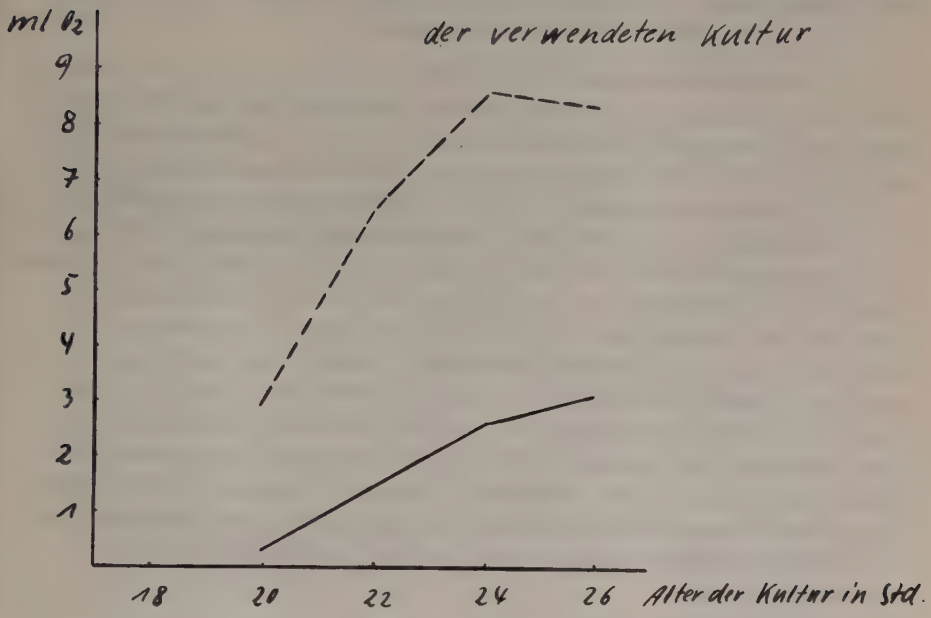
Zu b): Um den Einfluß der Kulturverdünnung auf die Empfindlichkeit des Testes gegenüber Hemmstoffen, insbesondere bei niederen Konzentrationen zu prüfen, wurde ein Versuch (Tab. 3) durchgeführt, bei dem Peptonwasser mit zwei verschiedenen Konzentrationen Chlortetracyclin versetzt und mit unterschiedlichen Kulturverdünnungen beimpft und bebrütet wurde. Mit jeder Kulturverdünnung wurde auch eine hemmstoffreie Probe beimpft und als Kontrolle gewertet.

Tab. 3 Abhängigkeit der Empfindlichkeit des Testes von der Dichte der Keimeinsaat

Chlortetracyclin ppm	Kulturverdünnung	Katalaseaktivität bezogen auf Kontrolle (in %)
0,1	1 : 5	43,1
	1 : 10	16,4
	1 : 15	8,5
0,01	1 : 5	75,4
	1 : 10	53,6
	1 : 15	38,8

Zur Feststellung des optimalen Alters der Gebrauchskultur wurden 20 bis 26 Stunden alte Kulturen sowohl ohne (Kulturkontrolle) als auch nach Bebrütung auf Katalaseaktivität (O_2-Bildung) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt. Das Alter der Gebrauchskultur erwies sich mit 22 bis 24 Stunden für die Durchführung des Testes als optimal.

Abb. 1: Abhängigkeit der Katalaseaktivität (O_2-Bildung) der Kulturkontrolle und der bebrüteten Probe vom Alter der verwendeten Kultur



– – – – – O_2-Bildung der bebrüteten Proben bei verschiedenem Alter der Kultur

——— O_2-Bildung der Kulturkontrolle bei verschiedenem Alter der Kultur

5. Bebrütungsart und -dauer

Für kurze Bebrütungszeiten ist das Wasserbad am besten geeignet (gute Wärmeleitung). Indessen ist die Bebrütung im Brutschrank dann nahezu gleichwertig, wenn die Nährlösung vor der Bebrütung auf Brutschranktemperatur gebracht wird, indem die Röhrchen vorher in Wasser angewärmt und dann abgetrocknet werden (Ausschluß von Verdunstungskälte).

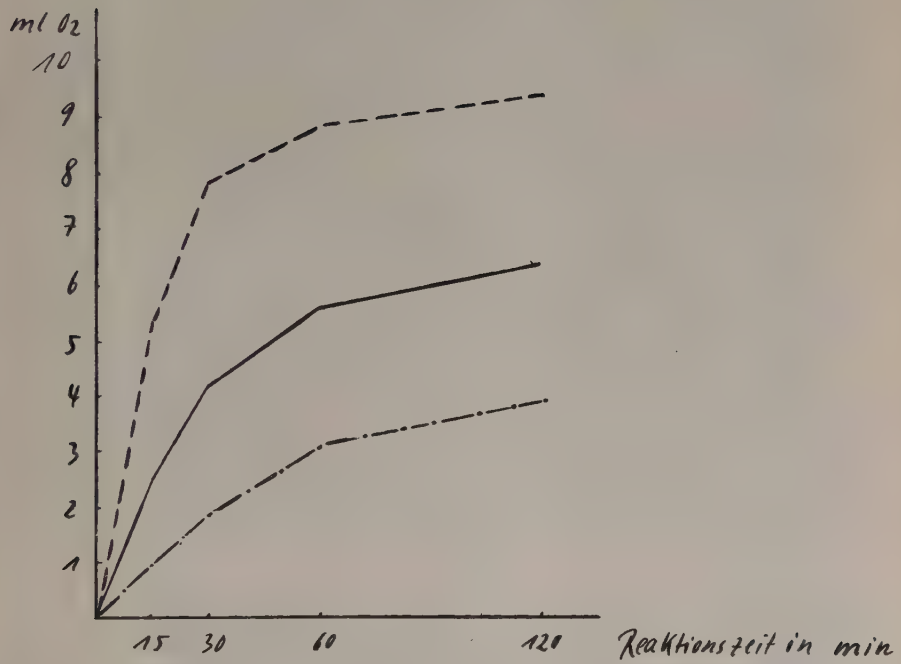
Die für den Test erforderliche Bebrütungsdauer läßt sich nicht generell angeben. Trotz gleichen Alters der Bouillonkultur können nämlich die Dichte der Keimeinsaat und damit auch die Katalaseaktivität nach der Bebrütung von Tag zu Tag schwanken. Die Katalaseaktivität soll aber nach der Bebrütung in den Kontrollen möglichst stark sein, damit eine ausreichende Differenzierung zwischen hemmstoffreier und eventuell hemmstoffhaltiger Lösung gegeben ist. Um dies zu gewährleisten, werden gleichzeitig mit der Beimpfung der fraglichen Proben und der Kontrollen in 3 Röhrchen je 1 ml der 1 : 20 verdünnten Kultur pipettiert, mit Peptonwasser auf 10 ml aufgefüllt und mit 3 ml 2 %iger H_2O_2-Lösung versetzt. Die Katalaseaktivität dieser Ansätze (Kulturkontrolle) wird nach 1 Stunde abgelesen. Aus der Kulturkontrolle ist indirekt zu entnehmen, wie dicht die Keimeinsaat war. Dadurch hat man die Möglichkeit, die Bebrütungsdauer der fraglichen Proben und der Kontrollen der Dichte der Keimeinsaat insofern anzupassen, als man bei geringer O_2-Bildung der Kulturkontrolle die Bebrütungszeit verlängern kann, um beim Vorliegen von Hemmstoffen zwischen hemmstoffreien und hemmstoffhaltigen Medien größere Unterschiede zu erhalten.

In eigenen Untersuchungen betrug die O_2-Bildung der Kulturkontrollen aller verwendeten 23 Stunden alten Kulturen zwischen 0,9 und 2,3 ml. Beträgt die Sauerstoffentwicklung durch die Katalase der Keimeinsaat bis zu 0,6 ml, so ist 4stündige Bebrütung der übrigen Proben erforderlich. Bei Gasentwicklung von etwa 0,6 ml bis 1 ml bzw. von 1 ml und darüber, brauchen die übrigen Proben nur 3 1/2 bzw. 3 Stunden bebrütet zu werden. Bei vollständiger Hemmung des Wachstums der Testkeime in einer Probe entwickelt diese annähernd gleich viel Sauerstoff wie die Kulturkontrolle.

6. Abhängigkeit der Katalaseaktivität von H_2O_2-Konzentration, Reaktionsdauer und Temperatur

Bei der angewandten Versuchsanordnung hat sich der Zusatz von 2- bis höchstens 3 %igen H_2O_2-Lösungen am günstigsten erwiesen, da bei größeren Kon-

Abb. 2: Abhängigkeit der Katalaseaktivität (O_2-Bildung) von Keimdichte und Reaktionszeit

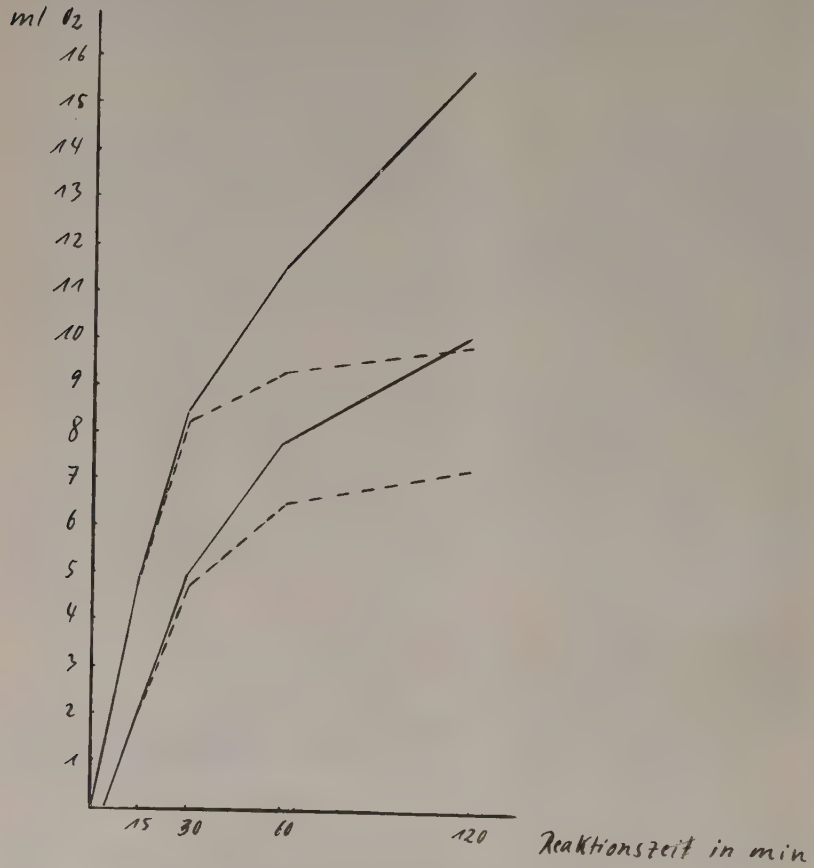


—·—·— geringes Wachstum der Testkultur

——— mäßiges " " "

– – – – starkes " " "

Abb. 3: Abhängigkeit der Katalaseaktivität (O_2-Bildung) vom Verdünnungsgrad der Kultur mit 2%iger H_2O_2-Lösung



a = 35 ml-Röhrchen ohne Hemmstoffe
b = 35 ml- " mit Hemmstoffen
a' = 15 ml- " ohne Hemmstoffe
b' = 15 ml " mit Hemmstoffen

zentrationen die Katalase offenbar inaktiviert wird und bei geringeren eine kleinere O_2-Ausbeute erzielt wird. Bei gutem Wachstum der Keime setzt eine starke O_2-Entwicklung ein, die nach den angegebenen Bebrütungszeiten fast immer über 6 ml ausmacht.

Im Interesse einer raschen Ablesung sollte der günstigste Zeitpunkt ermittelt werden (Abb. 2). Danach erfolgt die Abspaltung des Sauerstoffes nur in den ersten 30 Minuten gleichmäßig. Später tritt rascher Rückgang ein. Nach etwa 1 Stunde kommt es nahezu zum Stillstand; die darüber hinaus gebildete O_2-Menge ist so gering, daß sie außer Betracht bleiben kann. Der Rückgang der O_2-Bildung nach 30 Minuten tritt um so auffallender in Erscheinung, je höher der Bakteriengehalt der Probe ist. Bei mäßigem Wachstum geht die Peroxydspaltung kontinuierlich zurück, und bei niedrigem Keimgehalt, wie z. B. bei dem der Kulturkontrolle, verläuft die H_2O_2-Zersetzung beinahe gleichmäßig. Diese Unterschiede im Verlauf der Kurven gehen hauptsächlich darauf zurück, daß bei dichtgewachsenen Kulturen die H_2O_2-Spaltung anfänglich stürmisch verläuft, womit gleichzeitig auch viel keimhaltige und damit auch katalasehaltige Flüssigkeit verdrängt wird, die dann der Auswertung entzogen ist. Man kann diese Verluste an katalasehaltiger Flüssigkeit weitgehend verhindern, wenn man einen Katalaser verwendet, bei dem nicht das katalasehaltige Medium, sondern Wasser verdrängt wird (z. B. Katalaser nach Lobeck) oder indem man die Keimmenge in größeren Röhrchen mit einer größeren Menge an H_2O_2-Lösung versetzt. Dadurch wird die Katalase stärker verdünnt, und es wird durch die einsetzende Gasbildung wesentlich weniger Katalase verdrängt.

In dem vorstehend dargelegten Versuch (Abb. 3) wurden sowohl hemmstoffhaltige als auch hemmstoffreie Nährlösungen in Röhrchen mit 15 ml und 35 ml Rauminhalt bebrütet. Die Bedingungen waren für beide Versuchsanordnungen mit Ausnahme der H_2O_2-Zugabe gleich. Den 15 ml-Röhrchen wurden wie üblich 3 ml 2 %ige H_2O_2-Lösung, den 35 ml-Röhrchen 23 ml derselben Lösung zugesetzt. Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, daß die Katalaseausbeute bei starken Katalaseverdünnungen höher ist als bei niedrigen und daß dabei die Grenzen zwischen gehemmtem und ungehemmtem Wachstum der Kultur schärfer werden. Bei gleicher Hemmstoffkonzentration ergab der Ansatz mit stark verdünnter Katalase 36 % Hemmung, bezogen auf die Kontrolle, während die Hemmung in den kleinen Röhrchen mit relativ schwach verdünnter Katalase 26 % betrug.

Die Katalaseaktivität wird von der Temperatur nur wenig beeinflußt. Eine

Prüfung bei 37, 19 - 23 und 7° C ergab nur eine geringe Aktivitätsminderung bei 7° C, während in den anderen Temperaturbereichen keine bemerkenswerten Unterschiede aufgetreten waren, so daß demnach die Röhrchen nach H_2O_2-Zugabe auch bei Zimmertemperatur verbleiben können.

7. Zusammenfassung der optimalen Versuchsbedingungen

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen können folgende Versuchsbedingungen bei Verwendung des Staphylococcus aureus ATCC 6538-P als optimal angenommen werden: Der Teststamm muß vor seiner Verwendung 2 oder 3 Bouillonpassagen durchlaufen, bevor er dann nach 22- bis 24-stündiger Bebrütung mit Bouillon oder Peptonwasser 1 : 20 verdünnt, in der Menge von 1 ml auf 9 ml der fraglichen Probe oder den Kontrollen überimpft wird. Man verwendet für die Ansätze am vorteilhaftesten Kataläser, bei denen keine katalasehaltige Flüssigkeit verdrängt wird. Diese haben allerdings den Nachteil, daß sie kostspielig sind und viel Raum beanspruchen. In zweiter Linie empfehlen sich möglichst große graduierte Gläser (z. B. 30 ml), jedoch sind auch mit kleineren Röhrchen (15 ml, über 10 ml graduiert) brauchbare Resultate zu erzielen. Aus technischen Gründen wurden letztere in diesen Untersuchungen verwendet.

Der p_H-Wert des Substrats und dementsprechend auch der Kontrollen richtet sich nach dem Zweck der Untersuchung. Zur Erfassung der gebräuchlichsten Antibiotika, z. B. Penicillin und Tetracycline, empfiehlt sich ein p_H von 6,5. Sollen auch Konservierungsmittel erfaßt werden, die meist nur bei sauren Lebensmitteln in Betracht kommen, muß ein Ansatz auf p_H 5 eingestellt werden.

Die Bebrütungsdauer richtet sich nach der Kataläseaktivität der zugesetzten Kulturverdünnung. Wenn die Kulturkontrolle nach 1 Stunde 0,6 bis 1,0 ml O_2-Bildung ergibt, wird 3 1/2 Stunden bebrütet, bei geringerer Aktivität 4 Stunden und bei stärkerer 3 Stunden.

Die Bebrütung erfolgt bei 37° C am besten im Wasserbad. Nach der Bebrütung werden 2 ml bis 3 %ige H_2O_2-Lösung zugegeben und 1 Stunde darauf die O_2-Bildung erstmals abgelesen.

An Kontrollen sind erforderlich: die bereits erwähnte Kulturkontrolle, also beimpftes Peptonwasser, dem sofort H_2O_2 zugesetzt wird; die eigentliche Kontrolle, beimpftes Peptonwasser, das wie die fragliche Probe behandelt wird; Extraktkontrolle, ein mit H_2O_2 versetzter Extrakt der fraglichen Probe, um zu ermitteln, ob dieser eventuell Katalase enthält.

III. Prüfung des Katalase-Hemmstofftestes an hemmstoffhaltigen Nährlösungen

Peptonwasser wurde mit einer Reihe von Hemmstoffen in verschiedenen Konzentrationen versetzt und mit dem Katalase-Hemmstofftest untersucht.

Über die festgestellten Grenzkonzentrationen, bei denen noch eine Wachstumshemmung gegenüber der hemmstoffreien Kontrolle festzustellen war, gibt Tabelle 4 Aufschluß.

Tab. 4 Grenze der Nachweisbarkeit von in flüssigen Nährböden gelösten Hemmstoffen

Art des Hemmstoffes	nachweisbare Grenzkonzentration	geprüft bei p_H
Penicillin i. E/ml	0,005 - 0,01	6,5
Streptomycin ppm	1	6,5
Chlortetracyclin ppm	0,005 - 0,001	5 u. 6,5
Benzoesäure in %	0,001 - 0,005	5
Ameisensäure in %	0,1	6,5
Monobromessigsäure in %	<0,001	5
Sorbinsäure in %	0,001	5
Borsäure in %	0,01	5
Hexamethylentetramin in %	<0,001	5
Formalin (37 % Formaldehyd) in %	0,001	5 u. 6,5
Tego 51 in %	0,001	5 u. 6,5
Na-Pyrophosphat in %	0,05	5
	0,1	6,5

Wie aus Tabelle 4 ersichtlich ist, können die untersuchten Hemmstoffe zum Teil schon in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, daß es sich um Lösungen dieser Stoffe in flüssigem Nährboden handelte und die Hemmwirkung nicht durch andere Stoffe, wie sie z.B. in Lebensmitteln vorhanden sind, gestört oder verdeckt wurde.

Die Einstellung des p_H entsprach nur bei Penicillin der optimalen Wirksamkeit; bei Tetracyclin lag das p_H ungefähr im optimalen Bereich (6, 1) und bei Streptomycin weit davon entfernt (7, 8). Die Einstellung der konservierungsmittelhaltigen Proben auf p_H 5 erfolgte einerseits mit Rücksicht auf das Wirkungsoptimum der organischen Säuren oder deren Abkömmlingen, das un-

ter p_H 5,0 liegt, andererseits bietet p_H 5 noch die Möglichkeit guter Vermehrung für Staphylokokken, wobei auch die genannten Hemmstoffe in diesem Bereich noch gut wirksam sind. Als gehemmt galten alle Proben, die ein 1,2 ml (Sicherheitsbereich) unter dem Mittelwert der Kontrolle liegendes O_2-Volumen gebildet hatten. Da die Antibiotika in wässriger Lösung rasch inaktiviert werden - dies macht sich besonders bei niedrigen Antibiotikakonzentrationen bemerkbar - erfolgte unmittelbar nach deren Lösung in Peptonwasser die Beimpfung und Bebrütung.

IV. Prüfung des Katalase-Hemmstofftestes an hemmstoffhaltigen Lebensmitteln

1. Brühwurstkonserven

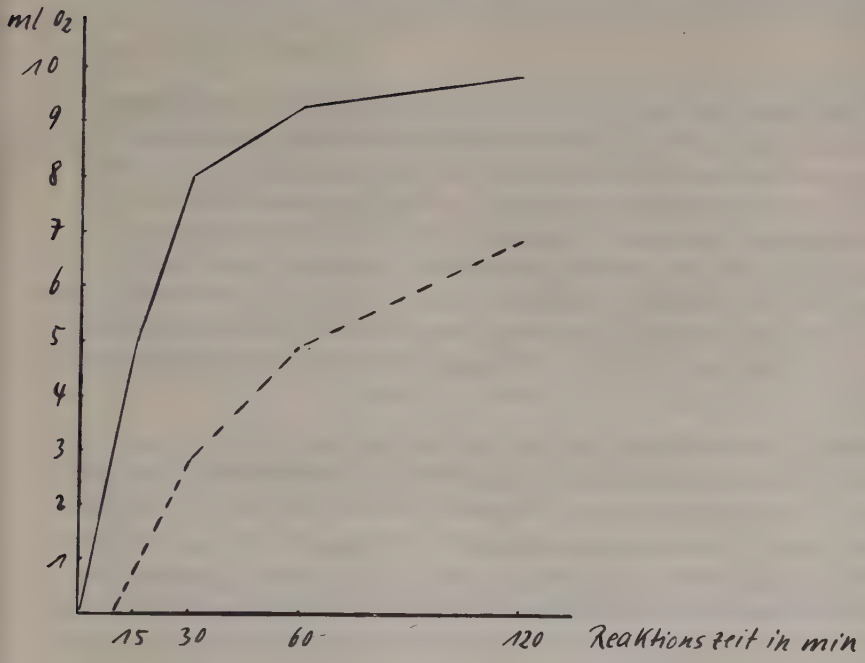
a) Material

Als Konservenfüllgut wurde Brät verwendet, das sich aus etwa 45 % Rindfleisch, 25 % Schweinespeck, 27 % Wasser und 3 % NaCl zusammensetzte. Davon wurden jeweils 200 g in Dosen abgewogen und Hemmstofflösungen verschiedener Konzentrationen zugesetzt und mit dem Brät gründlich vermischt. Es wurde auch Wurst ohne Hemmstoffe hergestellt, um zunächst einmal die Methodik zu erarbeiten. Anschließend erfolgte eine 60 Minuten lange Erhitzung im Wasserbad bei 100° C, was etwa der Hitzebehandlung von Halbkonserven entspricht, die ja in erster Linie für den Zusatz von Konservierungsmitteln in Betracht kommen.

b) Untersuchungstechnik

50 g des zu untersuchenden Wurstmaterials wurden bis zu breiartiger Beschaffenheit zerkleinert und mit 100 ml Peptonwasser (1 % Pepton, 1 % Dextrose, 1 % NaCl) von p_H 5 bzw. 6,5 versetzt, sehr gut durchgemischt und während einer halben Stunde öfters kräftig geschüttelt. Hierauf wurde filtriert und das p_H auf 5 bzw. 6,5 eingestellt. Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, das Filtrat 10 Minuten zu zentrifugieren, um zumindest die bei p_H 5 auftretenden flockigen Niederschläge aus dem Extrakt zu entfernen. Das an der Oberfläche angesammelte Fett wird ebenfalls beseitigt. Von jeder Probe pipettiert man je 9 ml in 3 Röhrchen, in die bereits vorher 1 ml einer 1 : 20 verdünnten Kultur gegeben wurde.

Abb. 4: Vergleich der Katalaseaktivität in hemmstofffreiem Peptonwasser und Wurstextrakt



——— O_2- Bildung in hemmstofffreiem Peptonwasser

– – – – – O_2- " " " Wurstextrakt

Um auch Hemmstoffe zu erfassen, die im alkalischen Bereich löslich und wirksam sind, kann man vom fraglichen Material auch einen Auszug mit Peptonwasser von entsprechendem p_H machen. Es empfiehlt sich, nach der Herstellung des Extraktes die Proben möglichst schnell zu beimpfen und zu bebrüten, um der Inaktivierung eventuell vorhandener, in wässriger Lösung instabiler Hemmstoffe zuvorzukommen.

c) Ergebnisse

Vor der Prüfung hemmstoffhaltiger Proben galt es zunächst festzustellen, inwieweit Wurstextrakt als Nährboden für Staphylokokken überhaupt geeignet ist, und ob diese Extrakte originäre Hemmstoffe enthalten oder solche, die sich aus den Ingredienzien oder beim Herstellungsprozeß (Erhitzung und Räucherung der Wurstmasse) ergeben. Als Vergleich diente auch hier die Peptonwasserkontrolle. Extrakt und Kontrolle unterlagen hinsichtlich p_H, Beimpfung und Bebrütung den gleichen Bedingungen. Die Ergebnisse wurden 2 Stunden nach der H_2O_2-Zugabe abgelesen; 1 Stunde Reaktionszeit erwies sich als zu kurz, da die H_2O_2-Zerlegung wesentlich langsamer und gleichmäßiger vor sich geht als bei reinem Peptonwasser.

Abbildung 4 stellt einen repräsentativen Vergleich zwischen der Katalasebildung einer hemmstoffreien Peptonwasserkontrolle und einem hemmstoffreien Wurstextrakt bei gleicher Beimpfung und Bebrütung dar. Die Extraktkurve verläuft flacher als die Peptonwasserkontrolle und erreicht auch nicht dieselbe Höhe; außerdem beginnt sie später als die andere. Die geringere Höhe ist der Ausdruck geringeren Wachstums der Testkeime. Da keine Hemmstoffe zugesetzt wurden, kommt nur Eigenhemmung als Ursache in Betracht.

Die Eigenhemmung kann auf Grund von Kurvenbeginn und Kurvenverlauf (in Abb. 4) auf reversible und irreversible Katalasehemmungen zurückgeführt werden. Folgender Versuch stützt diese Annahme: prüft man die O_2-Bildung von 1 : 20 verdünnter Kultur in 2 Gruppen, indem man je 1 ml in der einen Gruppe mit Peptonwasser, in der anderen mit hemmstoffreiem Wurstextrakt auf 10 ml auffüllt und jeweils 3 ml H_2O_2-Lösung zugibt, so stellt man beim Ablesen einen deutlichen Unterschied im O_2-Volumen der beiden Gruppen fest. Nach 1 Stunde erreichen die Extraktproben nur etwa 50 % der anderen. Im Laufe weiterer Stunden steigt die Gasmenge in der Extraktprobe weiter an, erreicht aber das Endvolumen der Peptonwasserprobe nicht. Da diese Unterschiede im Versuch nicht durch verschiedene Viskosität erklärt werden konnten, wird eine geringgradige reversible Katalasehemmung für die verzögerte und eine irreversible für die verminderte H_2O_2-Spaltung angenommen.

Gewürze, in den gebräuchlichen Mengen der Wurst beigegeben, bewirkten keine zusätzliche Hemmung. 0,2 % Paprika und 0,2 % Knoblauch im Wurstgut führten sogar zu einer Wachstumssteigerung gegenüber dem ungewürzten Wurstgut, die bei Knoblauch 18 % und bei Paprika 15 % betrug. Vielleicht handelt es sich hier um eine Stimulierung der Staphylokokken durch subbakteriostatische Mengen der im allgemeinen bakterizid oder bakteriostatisch wirkenden Gewürzbestandteile.

Aus Untersuchungen an 26 hemmstoffreien Brühwürsten, die fast ausschließlich aus Konserven stammten, ergaben sich folgende Werte:

Mittelwert:	25
Streuung:	± 8,9

Als Grenzwert[1] für Hemmungen, die auf das Vorliegen von Hemmstoffen zurückgeführt werden können, werden 50 % festgelegt. Dieser Grenzwert gilt jedoch nicht für Dosenwürstchen oder sonstige Dosenbrühwürste, die in Lake eingebettet sind. Dosenwürstchen werden im folgenden Abschnitt behandelt.

Brühwurst mit Hemmstoffzusätzen wurde nach der Herstellung abgekühlt und bei 7 - 10° C gelagert. Die Untersuchung des Füllgutes fand innerhalb von 10 Tagen nach der Herstellung statt.

In Tabelle 5 sind die nachgewiesenen Grenzkonzentrationen angegeben. Als positiv wurde nur eine Hemmung von über 50 % gewertet. Aus diesen Untersuchungen ist zu entnehmen, daß nachweisbare Hemmstoffkonzentrationen in Brühwurstkonserven im allgemeinen etwa 100- bis 1000mal so hoch sind wie die in Nährlösungen ermittelten Nachweisgrenzen.

1) Dieser Sicherheitsbereich zwischen Mittelwert und Grenzwert entspricht fast dem 3fachen der Streuung, so daß damit weitestgehende Sicherung des Ergebnisses gewährleistet ist.

Tab. 5 In Brühwurst nachgewiesene Grenzkonzentrationen

Art des Hemmstoffes	nachgewiesene Grenzkonzentr.	p_H-Wert des Extraktes
Streptomycin ppm	100	6,5
Penicillin in E/ml	10	6,5
Chlortetracyclin-HCl ppm	1	6,5 u. 5
p-Oxybenzoesäure in %	0,1	5
p-Chlorbenzoesäure in %	0,01	5
Borsäure in %	0,5	6,5 u. 5
Tego 51 in %	0,5	6,5 u. 5
Hexamethylentetramin in %	0,01	5
Na-Pyrophosphat in %	0,3	5
	1,0	6,5
Sorbinsäure in %	0,1	5
	0,5	6,5

2. Dosenwürstchen

a) Methodik

Bei Dosenwürstchen verwendet man zum Test zweckmäßigerweise die Lake, da diese bei eventuellen Hemmstoffbeigaben den Hemmstoff primär oder sekundär infolge Diffusion aus den Würstchen enthalten würde. Da Lake NaCl in genügender Konzentration enthält, gibt man lediglich 1 % Dextrose und 1 % Pepton zu, löst die Zusätze unter Schütteln und Erwärmen auf und filtriert, falls Schwebestoffe vorhanden sind. Der weitere Untersuchungsgang erfolgt in gleicher Weise wie bei Brühwurstextrakten. Die p_H-Einstellung der mit Pepton und Dextrose versetzten Lake erlangt besondere Bedeutung. Stellt man nämlich das p_H auf 5 ein, wie es zum Teil bei Brühwurstextrakten geschah, so unterbleibt auch ohne Hemmstoffzusatz in der beimpften und bebrüteten Probe das Wachstum der Keime. Bei diesem Säuregrad entsteht nämlich aus dem in der Lake vorhandenen Nitrit weitgehend undissoziierte salpeterige Säure, die bakteriostatisch oder sogar bakterizid wirken kann. Erst bei p_H 6,5 stellt sich ein für den Test ausreichendes Wachstum ein.

b) Ergebnisse

In Modellversuchen wurden zunächst 3 %ige Nitritpökelsalzlösungen verwendet, die kurz aufgekocht und dann bei Zimmertemperatur offen stehen blieben. Am 1., 2. und 4. Tage danach wurde der Hemmstofftest durchgeführt. Dabei ergaben sich gegenüber der Kontrolle in Peptonwasser Eigenhemmungen der Laken zwischen 10 und 30 %. Eine charakteristische Abnahme der Eigenhemmung an den 4 Untersuchungstagen infolge eventuellen Zerfalls von Nitrit war nicht zu beobachten.

Untersuchungen über Eigenhemmungen von Dosenlake, die an 15 Laken aus hemmstoffrei hergestellten Dosenwürstchen vorgenommen wurden, ergaben folgende Werte:

Mittelwert:	39,3
Streuung:	± 13,7

Als Grenzwert[1] für Hemmungen, die auf das Vorliegen von Hemmstoffen zurückgeführt werden können, wurden 80 % angenommen, während zwischen 70 und 80 % Verdacht besteht.

In weiteren Untersuchungen wurden 39 Würstchendosen verschiedener Herkunft im Handel gekauft. Davon wiesen 2 Proben totale Hemmungen auf, 3 andere lagen im Verdachtsbereich. Auffallenderweise zeigten Laken bestimmter Herkunft stärkere Hemmungen als andere. Hemmstoffe waren mit Sicherheit in den totalgehemmten Proben enthalten.

Zur Ermittlung nachweisbarer Hemmstoffkonzentrationen in Würstchenlake wurde 3 %ige abgekochte Nitritpökelsalzlösung mit Hemmstoffen versetzt, zu Würstchen in Dosen gegeben und diese 60 Minuten auf 80° C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Dosen in den Kühlschrank verbracht und nach 3 Monaten untersucht.

In Tabelle 6 sind die Konzentrationen angegeben, bei denen noch eine vollkommene Vermehrungshemmung der Testmikroben eintrat. Die Konzentrationen beziehen sich nur auf die Lakemenge, nicht auch auf die Wurstmasse, so daß die tatsächlichen Konzentrationen niedriger waren.

---

1) Die Differenz zwischen Mittel- und Grenzwert beträgt etwa das 3fache der Streuung, so daß damit weitestgehende Sicherung positiver Ergebnisse gewährleistet ist.

Tab. 6 Nachweisbare Grenzkonzentrationen in Lake von Dosenwürstchen

Art des Hemmstoffes	nachweisbare Grenzkonzentrat.	p_H-Wert der untersuchten Lake
Chlortetracyclin ppm	0,1	6,5
Borsäure in %	0,1	6,5
Benzoesäure in %	0,1	6,5
Hexamethylentetramin in %	0,01	6,5
Sorbinsäure	0,01	6,5

3. Dosenschinken (Kochschinken)

a) Untersuchungstechnik

Dosenschinken wird so fein als möglich zerkleinert, mit der doppelten Menge Peptonwasser von p_H 6,5 versetzt und unter Schütteln 5 Minuten bei 80° C erwärmt, um eine eventuell vorhandene originäre Katalase zu zerstören. Schinken, die unter Verwendung von Hemmstoffen hergestellt worden sind, benötigen keine so eingehende Erhitzung, so daß gerade in diesen Fällen am ehesten mit originärer Katalase zu rechnen wäre. Nach Erhitzung des Gemenges wird rasch abgekühlt, filtriert, auf p_H 6,5 eingestellt und bebrütet.

b) Ergebnis

Bei 4 untersuchten hemmstoffreien Kochschinken betrug die Eigenhemmung 42 - 62 % im Vergleich zur Peptonwasserkontrolle. 2 Dosenschinken aus dem Handel zeigten vollkommene Hemmung im Katalasetest. Ein spezifischer Antibiotikatest ergab bei dem einen Schinken eine 0,5 ppm Chlortetracyclin äquivalente Hemmstoffkonzentration. Es wurde später in Erfahrung gebracht, daß die Herstellung von Dosenschinken in dem Ursprungsbetrieb (Ausland) unter Anwendung von Chlortetracyclin erfolgt.

4. Fisch und Geflügel

Für Fisch und Geflügel kommt in erster Linie die Konservierung mit Tetracyclinen in Frage, die in einigen überseeischen Ländern auch zugelassen ist.

a) Untersuchungstechnik

Für die Herstellung von Extrakten gilt im allgemeinen das gleiche wie für Brühwurst und Schinken. Bei Geflügel verwendet man hierzu die Haut, da

die Tierkörper in Antibiotikalösungen getaucht werden und sich hierbei der Hemmstoff in der Haut am stärksten anreichert. Die Zerkleinerung der Haut bereitet zwar Schwierigkeiten, muß aber dennoch bestmöglich geschehen. Zur Inaktivierung der Gewebskatalase genügt Erhitzung der in Peptonwasser aufgeschwemmten Hautteile bei 80° C für 10 Minuten.

Bei Fischen wird der Extrakt aus Haut oder oberer Muskelschicht hergestellt. Nach 15 Minuten langem Erwärmen bei 80° C ist die originäre Katalase zerstört.

Sowohl Fisch- als auch Geflügelextrakte werden rasch abgekühlt, filtriert und das p_H auf den für Tetracycline optimalen Wert von 6,1 eingestellt.

b) Ergebnisse
In Vorversuchen an hemmstoffreiem Geflügel und hemmstoffreien Fischen wurden Eigenhemmungen festgestellt, die annähernd den bei Brühwurst ermittelten entsprachen.

Extrakte aus Geflügel, das 1/2 Stunde in Acronize-Lösung (5 ppm Aureomycin in Wasser) getaucht und anschließend bei 7 - 10° C 24 Stunden aufbewahrt wurde, zeigte vollkommene Hemmung der Testmikroben. 3 Tage mit Acronize (5 ppm Aureomycin in Wasser) beeiste Fische ergaben sowohl 14 Stunden als auch 3 Tage nach Entfernung der Eisstücke bei einer Lagerungstemperatur von 7 - 10° C völlige Hemmung des Wachstums der Testkeime.

D. Diskussion

Bei Hemmstofftesten, die mit Farbindikatoren durchgeführt wurden, störte in manchen Fällen die Eigenfarbe des Substrates. Es wurde daher erwogen, volumetrische Methoden zu verwenden, von denen saccharometrische Teste ausschieden, da Zeitaufwand und Laufdauer zu groß sind und bei der üblichen Verwendung von Hefen Antibiotika unberücksichtigt bleiben. TERPLAN (84) hatte aus diesem Grunde eine Methode empfohlen, bei der die Katalaseaktivität von besonders empfindlichen Testkeimen volumetrisch erfaßt wird und daraus Rückschlüsse auf eventuelle Hemmungen möglich sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Grundlagen für den Katalasetest erarbeitet und seine Anwendungsmöglichkeit bei verschiedenen Lebensmitteln geprüft werden.

Es zeigte sich, daß Staphylokokken, die schon von KOTTER, TERPLAN und SCHULZ (42) für den TTC-Test empfohlen wurden, für diese Methode gut geeignet sind, zumal sie reichlich Katalase bilden und in einem weiten p_H-Bereich gut wachsen. Sie können selbst zum Nachweis von Konservierungsmitteln verwendet werden, die erst unterhalb von p_H 5,5 wirken. Im allgemeinen besteht jedoch für den Nachweis solcher Stoffe (z. B. Benzoe- und Sorbinsäure) bei von Tieren stammenden Lebensmitteln kein besonderes Bedürfnis, da diese p_H-Bereiche nur bei Rohwürsten, Sülzen und Salaten vorkommen. Bei ersteren ist die Verwendung von Konservierungsmitteln kontraindiziert, weil ohne Flora die Reifung beeinträchtigt wäre. Bei Sülzen und Salaten reicht im allgemeinen schon die Gewürzsäure aus, um konservierend zu wirken; bei einigen Salaten ist ohnehin der Zusatz bestimmter Konservierungsmittel zulässig.

Diese Methode hat den Vorteil, daß sie im Gegensatz zu anderen unspezifischen Hemmstoffen sicherer zu objektivierbaren Ergebnissen führt, für deren Berechnung folgende Daten zur Verfügung stehen:

E = O_2-Bildung im beimpften, bebrüteten und mit H_2O_2 versetzten fraglichen Extrakt;

P = O_2-Bildung im beimpften, bebrüteten und mit H_2O_2 versetzten, hemmstoffreien Peptonwasser (Peptonwasser oder eigentliche Kontrolle);

B = O_2-Bildung im beimpften, aber unbebrüteten und mit H_2O_2 versetzten Peptonwasser (Kulturkontrolle oder Blindprobe);

K = O_2-Bildung im unbeimpften, unbebrüteten, mit H_2O_2 versetzten fraglichen Extrakt.

Die Hemmung wird nun prozentual auf die Peptonwasserkontrolle (P) bezogen; vorher müssen allerdings die Werte subtrahiert werden, die auf bereits mit der Impfmenge zugesetzte Katalase zurückzuführen sind (B) oder auf bereits im fraglichen Extrakt vorhandene Katalase (K).

Die Formel für die Berechnung der Hemmung lautet folgendermaßen:

$$100 - \frac{E - (B + K)}{P - B} \cdot 100 = \text{Hemmung in \%}$$

Bei der Prüfung von Hemmstoffen, die flüssigen Nährmedien zugesetzt wurden, erwies sich der Test als sehr empfindlich. Diese Empfindlichkeit wird um das 100- und häufig um das 1000fache eingeschränkt, wenn die Hemmstoffe Lebensmitteln zugesetzt werden. Zum Teil ist dies darauf zurückzuführen, daß die Hemmstoffe bei der Extraktion 3fach verdünnt werden; ferner dürfte ein Teil bei der Erhitzung inaktiviert werden, insbesondere sofern es sich um Antibiotika handelt, und schließlich bewirken auch schon die Extrakte aus hemmstoffreien Lebensmitteln zum Teil recht erhebliche Hemmungen, so daß eine sichere Aussage über das Vorliegen von Hemmstoffen erst bei starken Hemmungen möglich ist. Geringe Hemmstoffkonzentrationen können daher von unspezifischen Hemmungen nicht unterschieden werden. Eine einheitliche Beurteilung der Hemmungen in verschiedenen Extrakten ist außerdem nicht möglich, da unspezifische Hemmungen schon je nach Beschaffenheit des entsprechenden Lebensmittels stark variieren. Bei Brühwurst lassen erst Hemmungen $>$ 50 % mit Sicherheit auf die Anwesenheit von Hemmstoffen schließen. Für Dosenlake muß dieser Sicherheitsbereich sogar auf 80 % erhöht werden. Bei Dosenschinken, Fisch und Geflügel genügte die Anzahl der untersuchten hemmstoffreien Proben nicht, um sichere Grenzwerte angeben zu können, doch dürften bei Dosenschinken erst Hemmungen $>$ 80 %, bei Fisch und Geflügel $>$ 50 % die Anwesenheit von Hemmstoffen bestätigen. Es ist allerdings vorstellbar, daß der Hemmstofftest an Würstchenlake, eventuell auch bei Kochschinken noch verbessert werden kann, wenn durch eine entsprechende Behandlung das Nitrit beseitigt werden kann. Imponderabel sind allerdings Räucherstoffe, die je nach Art und Dauer der Räucherung immer gewisse Schwankungen verursachen dürften.

E. Zusammenfassung

1. Zum Nachweis von Hemmstoffen in Nahrungsmitteln tierischer Herkunft sind unspezifische biologische Methoden erforderlich, die ausreichende Feinheit besitzen und sich für Einzel- wie Reihenuntersuchungen eignen.

2. Es wurden Grundlagen für einen Test erarbeitet, der darin besteht, aus fraglichen Nahrungsmitteln mit Peptonwasser einen Extrakt herzustellen, der mit Staphylococcus aureus ATCC Nr. 6538-P beimpft, bebrütet und anschließend mit Wasserstoffsuperoxyd versetzt wird. Die durch Bakterienkatalase abgespaltene Sauerstoffmenge wird mit der einer hemmstofffreien Kontrolle verglichen und aus einer eventuellen Differenz auf die Anwesenheit oder das Fehlen von Hemmstoffen in der fraglichen Probe geschlossen.

3. Die Empfindlichkeit der Methode ist in hemmstoffhaltigen, reinen Nährlösungen etwa 100- bis 1000mal größer als in Extrakten aus Lebensmitteln. Die meisten dieser Extrakte weisen erhebliche Eigenhemmungen auf, so daß erst relativ hohe Hemmwirkungen auf die Anwesenheit von Hemmstoffen schließen lassen. Bei Brühwürsten, Geflügel und Fisch ist der Verdacht erst ab 50 % Hemmung, bei Dosenschinken und Laken erst ab 80 % auf das Vorliegen von Hemmstoffen bestätigt.

F. Literaturverzeichnis

1. Abbey, A., A.R. Kohler u. S.D. Upham: Effect of aureomycin chlortetracycline in the processing and storage of freshly shucked oysters. Food Technol. 11 (1957), 265;

2. Anders, H.: p-Oxybenzoesäureester für Konservierungszwecke. Dt. Lebensm. Rdsch. 52 (1956), 110;

3. Andersen, A.A. u. H.D. Michener: The complementary action of subtilin and mild heat. Food. Technol. 4 (1950), 188;

4. Autenrieth-Keller: Quantitative chemische Analyse. Verlag Theodor Steinkopff, Dresden u. Leipzig 1951;

5. Baetsle, R., D.A.A. Mossel u. H. Verheyden: Ann. Fals. Fraudes 48 (1955), 412; zit. nach Mossel (58);

6. Benarde, M.A. u. R.A. Littleford: Antibiotic treatment of crab and oyster meats. Appl. Microbiol. 5 (1957), 368;

7. Bernaerts, M.J.: Über den unspezifischen Nachweis von Konservierungsmitteln in Marmelade mittels osmophiler Hefen. Z. Lebensm.-Unters. 104 (1956), 405;

8. Bingold, K. u. W. Lang: Die Bakterienkatalase. Zbl. Bakter. I. O. 163 (1955), 357;

9. Blyth, M.W.: Detection and estimation of preservatives in milk. Z. Lebensm.-Unters. 5 (1902), 172; Analyst 16 (1901), 148, ref.

10. Bujwid, O.: Differenzierung von Bakterienkulturen infolge Spaltung von H_2O_2. Zbl. Bakter. I. O. 77 (1916), 440;

11. Clarenburg, A. u. E.H. Kampelmacher: Die Bedeutung von Antibiotika für die bakteriologische Fleischbeschau mit besonderer Berücksichtigung der Milzbrand- und Salmonellendiagnostik. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 70 (1957), 203;

12. Coretti, K.: Versuche über eine mikrobiologische Methode zum Nachweis von Konservierungsmitteln in Fleischwaren. Jahresbericht 1955 der Bundesforschungsanstalt für Fleischwirtschaft, Kulmbach, S. 29;

13. Coretti, K.: Mikrobiologischer Nachweis von Hemmstoffen in Gelatine. Fleischwirtschaft 11 (1959), 737;

14. Dorner, G. u. T. Lammers: Hautarzt 2 (1951); zit. nach H. Vonderbank: Aureomycin und Achromycin. Editio Cantor, Aulendorf i. Württ. (1956), 30;

15. Drieux, R. u. J.P. Thiéry: La recherche des antiséptiques dans les boîtes de conserves. Bull. Acad. Vet. France 17 (1944), 89; zit. nach Mossel (58);

16. Eisenbrand, J., A. Klauck u. D. Pfeil: Azofarbstoffe als Indikatoren für den Nachweis von Konservierungsmitteln und verwandten Stoffen im mikrobiologischen Ansatz. Naturwissensch. 43 (1956), 519;

17. Firmann, M.C., A. Abbey, M.A. Darken, A.R. Kohler u. S.D. Upham: Effect of aureomycin- chlortetracycline on fish freshness. Food Technol. 10 (1956), 381;

18. Fleischmann, K.: Läßt sich Penicillin in der Milch nachweisen? Dt. Molkerei-Ztg. 75 (1954), 534;

19. Gabel, W.: Konservierungsmittel. Versuch einer Begriffsbestimmung. Dt. Lebensm. Rdsch. 47 (1951), 98;

20. Gibson, F.S., Kohler, A.R. u. C.R. Hines: Abs. Nr. 46, 15th Ann. Meeting, Inst. of Food Techn. 2. zit. nach White-Stevens (89);

21. Goldberg, H.S., H.H. Weiser u. F.E. Deatherage: Studies on meat. The use of antibiotics in preservation of fresh beef. Food Technol. 7 (1953), 165;

22. Gottstein: Virchows Arch. C 33 (1893), zit. nach Stapp (79);

23. Grau, R.: Untersuchungen mit Aureomycin in der Fleischkonservierung; in: Die Bedeutung der Antibiotika in der Tierernährung und Lebensmittelhygiene unter besonderer Berücksichtigung von Aureomycin. Editio Cantor/Aulendorf in Württ. 1957, S. 136;

24. Heatley, N.G.: Biochem. J., London 38 (1944), 61; zit. nach (58);

25. Hennecke, H.: Betrachtungen über Milchsäure. Neue Fleischer-Ztg. 69 (1952), Nr. 7;

26. Henry, W. u. M. Stacey: Chem. Abstr. 41 (1947), 2459; zit. nach Hirsch (27);

27. Hirsch, P.: Chemische Konservierung von Lebensmitteln. 2. Aufl. 1956, Verlag Theodor Steinkopf, Dresden u. Leipzig;

28. Höring, F.: Unzulässige Hilfsmittel der Fleischerei?
Dt. Lebensm. Rdsch. 1930, S. 43;

29. Hotchkiss: Ann. Microbiol. 2 (1948), 184;
zit. nach Hirsch (27);

30. Jacobson, J.: Untersuchungen über lösliche Fermente.
Hoppe-Seylers Zschr. f. phys. Chemie 16 (1892), 340;

31. Jacquet, J. u. L. Steeg: Méthode microbiologique de diagnose et de titrage des antibiotiques présents dans le lait et les produits laitiers.
Ann. Fals. Fraudes 46 (1953), 5;

32. Janiczek, J.V.: Untersuchung über die Verlängerung der Frischhaltung geschlachteter Hühner unter Verwendung von Penicillin und Chlortetracyclin. Vet. Diss. Wien 1957;

33. Janke, A. u. R.C. Janke: Über die Erhöhung der Haltbarkeit geschlachteter Hühner durch Behandlung mit Chlortetracyclin.
Zbl. f. Bakter. II 111 (1958), 291;

34. Kalich, J. u. M. Merkenschlager: Zur Frage des Salmonelle-Nachweises in Organen nach Antibiotika-Therapie bzw. Beifütterung.
Tierärztl. Umschau 13 (1958), 324;

35. Klein, P.: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer Verl. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957;

36. Klimmer-Schönberg: Milchkunde. Verl. Richard Schoetz, Berlin 1947;

37. Kline, E.F. u. Mitarb.: Improved quality of fish fillets as a result of a food grade of chlortetracycline. Antib. Annual 1956-57, 997;

38. Kluyver, A.J.: Biochemische Suikerbepalingen.
Diss. Univ. Delft 1914, 129; zit. nach Mossel (58);

39. Koch, F.E.: Elektiv - Nährböden für Staphylokokken.
Zbl. f. Bakt. I, Orig. 149 (1943), 122;

40. Kohler, A.R., W.H. Miller u. H.P. Broquist: Aureomycin chlortetracycline and the control of poultry spoilage. Food Technol. 9 (1955), 151;

41. Kotter, L. u. H. Muspach: Zur Beurteilung des Keimgehaltes von Trockenmilch, Magermilch und Milcheiweißpräparaten.
Milchwissenschaft 13 (1958), 122;

42. Kotter, L., G. Terplan u. H. Schulz: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischer Herkunft. Arch. Lebensmittelhyg. 10 (1959), 145;

43. Kreuzer, R.: Zur Frage der Verwendung von Antibiotika (Aureomycin) zur Frischhaltung von Seefischen. Allg. Fischwirtschafts-Ztg. 1957, Nr. 13/14;

44. Leber, H.: A resazurin starter activity test. Milk Plant Monthly 39 (1950), 40;

45. Legler, F., F. Burkhardt u. W. Wendrich: Staph. aureus im Camembert-Käse als Ursache von Lebensmittelvergiftungen. Öffentl. Gesundheitsdienst 19 (1957), 198;

46. Lerke, P.A. u. L. Farber: Prolongation of the keeping quality of fish and shellfish by antibiotics. Antib. annual 1956-1957, 1418;

47. Lignières, J.: La recherche des qualités normales du lait par la culture de microbes appropriés. Compt. Rend. Soc. Biol. 82 (1919), 1094, zit. nach Mossel (58);

48. Lochmann, E.-H.: Kann das Ergebnis der bakteriologischen Fleischuntersuchung durch zur Zeit im Organismus befindliches Penicillin beeinflußt werden? Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1955), 251;

49. Loew, O.: Zur Unterscheidung zweier Arten Katalase. Zbl. Bakter. II. 10 (1903), 177; zit. nach Stapp (79);

50. Lorenz, W.: Die Verfütterung von Aurofac vom Standpunkt der Lebensmittelkontrolle, in: Die Bedeutung der Antibiotika in der Tierernährung und Lebensmittelhygiene unter besonderer Berücksichtigung von Aureomycin. Editio Cantor/Aulendorf i. Württ. 1957, S. 180;

51. Lück, H.: Einfluß von Konservierungsmitteln auf Häminenzyme. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 108 (1958), 1;

52. Lührig, H. u. A. Sartori: Gärungshemmungen zuckerhaltiger Lösungen durch Konservierungsmittel. Pharmazeut. Zentralhalle 49 (1908), 934;

53. Meyer, R.: Zur Isolierung von Staphylokokken aus stark verunreinigtem Material unter Ausnutzung der Kochsalzresistenz. Zbl. Bakter. I 149 (1943), 122;

54. Mijl Decker, L.P. v.d., D.A.A. Mossel, A.S. de Bruin u. A.Manten: The presumptive detection of some antibiotics in foods using a simple microbiological test. Sci. Food Agric. 10 (1959), 475;

55. Mokhardt, A.: Vergleichende Untersuchungen über den Wert der Testmethoden für die Prüfung der Antibiotika. Diss. Univ. Rostock 1956;

56. Morgulis, S. u. I. Bercovici: Studien über die Inaktivierung der Katalase. 7. Biol. Chem. 92 (1931), 377; ref. Z. Lebensmittel-Untersuch. 73 (1937), 207;

57. Morley, D.C.: J. Path. Bact. 57 (1945), 379; zit. nach Mossel (58);

58. Mossel, D.A.A.: Aufgaben und Durchführung der modernen hygienisch-bakteriologischen Lebensmittelüberwachung. Wiener Tierärztl. Monatsschrift 43 (1956), 321, 596;

59. Mossel, D.A.A.: The aspecific detection of preservatives in foods by a simple fermentation test with special reference to cured meat products. Analyst 79 (1954), 433;

60. Mossel, D.A.A.: Probleme einer wissenschaftlich begründeten bakteriolog. Untersuchung von Fleischkonserven mit Hinweis auf deren Lösung. Fleischwirtsch. 8 (1956), 559;

61. Mossel, D.A.A.: The Kluyver fermentation test for detecting preservatives in foods. Food Manufact. 31 (1956), 190;

62. Mossel, D.A.A. u. A.S. de Bruin: The detection of preservatives in beverages by a fermentation test, with special reference to brominated compounds. Analyst 78 (1953), 37: ref. Z. Lebensmittel-Untersuch. 99 (1954), 163;

63. Mossel, D.A.A., I.G. Mandersloot u. A.S.S. Gentis: A simplified microbiological test for the detection of preservatives in milk and milk products. Neth. Milk Dairy J. 9 (1955), 63;

64. Neal, C.F. u. H.E. Calbert: The use of tetrazolium salts as indicators for lactic starter inhibitory substances. 4. Internat. Dairy Congress Proceedings, Rom 1956. Vol. 2, Part. II, 309;

65. Partmann, W.: Über die Wirksamkeit einiger für die Fischbeeisung vorgeschlagener bakterizider Substanzen. Dt. Lebensm.-Rdsch. 49 (1953), 265;

66. Pikkarainen, I.: Über Nahrungsmittelvergiftungen, verursacht durch Staphylococcus aureus. Zbl. Bakt. I O. 143 (1938/39), 60;

67. Prost, E.: Próby zastosowania antybiotyków w przetwórstwie konserwowym na przykładzie gulaszu angielskiego (Chopped Pork), Ann. Univ. Lublin-Polonia, Sectio DD 8 (1953), 4;

68. Raible, K.: Über den Einfluß des Alters der Testmikroben-Kulturen auf die Wirkung chemischer Konservierungsmittel. Dt. Lebensm. Rundsch. 53 (1957), 198;

69. Raible, K.: Über den Einfluß unterschwelliger Konzentrationen von Benzoesäure, Sorbinsäure und Salizylsäure auf die Vermehrung und den Stoffwechsel einiger Arten von Bakterien und Hefen. Zbl. Bakt. II 112 (1959), 953;

70. Raible, K. u. G. Busch: Verfahren zur Bestimmung der antimikrobiellen Wirksamkeit von chemischen Konservierungsmitteln. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 105 (1957), 174;

71. Rauscher, K. u. H. W. Ardelt: Zur Frage der Konservierung von Lebensmitteln mit Dehydracetsäure. Pharmaz. 9 (1954), 501; ref. Z. Lebensmitt.-Untersuch. 102 (1955), 381;

72. Rolle, M.: Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre. 2. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart. 1958, S. 157;

73. Schelhorn, M.: Hemmende und abtötende Wirkung von Konservierungsmitteln. Arch. Mikrobiol. 19 (1953), 30;

74. Schelhorn, M. v.: Untersuchungen über Konservierungsmittel. Dt. Lebensm. Rdsch. 46 (1950), 151; 47 (1951), 128, 170; 48 (1952), 16, 102; Z. Lebensm.-Untersuch. 92 (1951), 256;

75. Schlunk, F.: Der Zweck der Katalase bei den Bakterien und ihre Bewertung als Ferment. Zbl. Bakt. I O. 92 (1924), 116;

76. Schönbein, I.: Über die katalytische Wirksamkeit organischer Materialien und deren Verbreitung in der Pflanzen- und Tierwelt. Erdmanns J. F. prakt. Chem. 89 (1863), 323;

77. Schönberg, F.: Die Untersuchung von Tieren stammender Lebensmittel. 7. Auflage. Verlag Schaper, Hannover 1959, S. 91;

78. Shahani, K.M.: Factors affecting terramycin activity in milk, broth, buffer and water. Dairy Sci. 41 (1958), 382;

79. Stapp, C.: Über Katalase und Peroxydase bei Bakterien. Zbl. Bakt. I O. 92 (1924), 161;

80. Süple, K.: Ist die Konservierung von Nahrungsmitteln ein Fortschritt für die Ernährung? Fortschr. d. Therapie 7 (1931), 641;

81. Tarr, H.L.A.: Antibiotika bei der Frischfisch-Konservierung. Die Fisch- und Feinkostindustrie 30 (1958), 13, 31;

82. Tarr, H.L.A.: zit. nach White-Stevens (89);

83. Theorell u. Chance: zit. nach Bingold (8);

84. Terplan, G.: Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Fleischkonserven. Arch. Lebensm. Hyg. 11 (1960), 37;

85. Thénard: zit. nach Schönbein (76);

86. Vaughn, R.H., Charles, W. Nagel, F. Miles Sawyer u. G.F. Stewart: Antibiotics in poultry meat preservation. Food Technol. 11 (1957), 426;

87. Waentig u. Gierisch: Über die chemische Natur der Katalase. Fermentforsch. 1 (1914/16), 165; ref. Z. Lebensm. Unters. 35 (1918), 447;

88. Weiser, H.H., H.S. Goldberg, V.R. Cahill, L.E. Kunkle u. F.E. Deatherage: Observations of feesh meat processed by the infusion of antibiotics. Food. Technol. 7 (1953), 495;

89. White-Stevens, R.: Die Anwendung von Aureomycin (Chlortetracyclin) zur Verlängerung der Haltbarkeit von Geflügel, Fleisch und Fisch; in: Die Bedeutung der Antibiotika in der Tierernährung und Lebensmittelhygiene unter besonderer Berücksichtigung von Aureomycin. Editio Cantor/Aulendorf in Württ. 1957, S. 104;

90. Zeile, K. u. H. Hellström: Über die aktive Gruppe der Leberkatalase. Hoppe Seylers Zeitschr. Phys. Chem. 192 (1930), 171;

91. N.N.: Antibiotika in der Fleischkonservierung. Allg. Fleischer-Z. 40 (1956); 49 (1956); 70 (1956);

92. N.N.: Benzoesäure als Konservierungsmittel. Allg. Fleischer-Z. 54 (1950);

93. N. N.: Konservierungsmittel-Vorschläge für die Zulassung im neuen Gesetz. Allg. Fleischer-Z. 78 (1952);

94. N. N.: Acroneis zur Frischhaltung von Fischen. Fischwaren- und Feinkostindustrie 28 (1956), 128; 29 (1957), 83; 30 (1959), 56, 67.

Am Ende meiner Arbeit danke ich
Herrn Professor Dr. L. Kotter für
die Überlassung des Themas und die
immer gern erteilten Ratschläge.

Ebenso gilt mein Dank
Herrn Dr. G. Terplan für zahlrei-
che Hinweise und sein immer freund-
liches Entgegenkommen.

L e b e n s l a u f

Am 22. 12. 1934 wurde ich als Sohn des Landwirts Karl Kretzer und dessen Ehefrau Maria, geb. Romer, in Haidgau geboren.

Nach 4jährigem Besuch der dortigen Volksschule trat ich 1945 in das Humanistische Gymnasium Salvatorkolleg zu Bad Wurzach ein, wo ich im März 1954 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1954 begann ich das Studium der Tiermedizin in München und schloß es hier im Februar 1959 mit dem Staatsexamen ab.